

Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Auswirkungen des kleinmolekularen CXC-Rezeptor 4 Inhibitors
AMD3456 auf die Neointimabildung nach Induktion der akzelerierten
Atherosklerose in ApoE-defizienten Mäusen**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Davor Zagorac

aus

Banjaluka, Bosnien und Herzegowina

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Schober
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Martin Dickgans Priv. Doz. Dr. Robert David
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	26.01.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Native Atherosklerose.....	5
1.2	Akzelerierte Atherosklerose	6
1.3	Restenose und Neointimaformation	7
1.4	Herkunft der neointimalen SMC	10
1.5	Chemokin SDF-1 α - und CXCR4-Biologie	12
1.6	Bedeutung der SDF-1 α und seinen Rezeptors CXCR4 bei atherosklerotischen Erkrankungen	13
1.7	Rolle der SDF-1 α / CXCR4 Achse bei der Neointimabildung.....	14
1.8	Therapeutische Optionen zur Hemmung der Restenose.....	16
1.9	Nicht-Peptid-CXCR4-Antagonisten, Mono- und Bicyclame	17
2	Zielsetzung	19
3	Methoden und Material	20
3.1	Antikörper	20
3.2	Reagenzien	21
3.3	Geräte.....	22
3.4	Verbrauchsmaterialien.....	22
3.5	Anmerkung zu den Tierversuchen	23
3.6	Versuchsablauf.....	23
3.7	Versuchstiere, Tierhaltung und atherogene Diät	24
3.8	Induktion der akzelerierten Atherosklerose durch endotheliale Denudation der A. carotis communis am Mausmodell	25
3.9	Anästhesie der Versuchstiere	26
3.10	AMD3465-Applikation	27
3.10.1	Osmotische Minipumpe	27
3.10.2	Befüllung und Starten der Pumpe	28
3.10.3	Implantation der Pumpe.....	28
3.11	Durchflusszytometrische Messung der SPCs.....	29
3.11.1	Durchflusszytometrie	29
3.11.2	Blutentnahme	31
3.11.3	Vorbereitung der Proben für die Messung	31
3.11.4	Messung und Auswertung der Proben	32
3.12	Vorbereitung der histologischen Präparate und histologische Färbungen.....	35
3.12.1	Entnahme der CCA.....	35

3.12.2	Paraffineinbettung und Herstellung der seriellen histologischen CCA-Schitte	35
3.12.3	Modifizierte Movat-Pentachrom-Färbung	35
3.12.3.1	Färbereagenzien und Protokoll der Movat-Färbung	36
3.12.4	Immunohistochemie und Immunfluoreszenz	39
3.12.4.1	Immunohistochemie für α -SMA	39
3.12.4.2	Immunfluoreszenzfärbung für Mac-2	40
3.12.4.3	Immunfluoreszenzfärbung für VE-Cadherin	41
3.12.4.4	Immunfluoreszenzfärbung für Ki67	42
3.13	Mikroskopie und morphometrische Analyse	43
3.14	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Neointima- und Mediafläche nach AMD3465-Behandlung	46
4.2	Charakterisierung der zellulären Plaquezusammensetzung	48
4.2.1	Anteil der glatten Muskelzellen und Makrophagen an der Neointima	48
4.2.2	Einfluss von AMD3465 auf histologische Parameter der Plaquestabilität	50
4.3	Reendothelialisierung nach AMD3465 Behandlung	51
4.4	AMD3465 und Proliferation neointimaler Zellen	53
4.5	Auswirkung der AMD3465-Behandlung auf Mobilisation der SPCs nach Gefäßverletzung	54
4.6	Ergebnissübersichtstabelle	58
5	Diskussion	59
5.1	Das CXC Chemokin SDF-1α und der Rezeptor CXCR4	60
5.2	Die SDF-1α/CXCR4 Achse bei der Reparatur von Gewebeschädigung durch Stammzellen und deren Einfluss auf die Neointimabildung	62
5.3	Kleinmolekulare CXCR4-Antagonisten	66
5.3.1	Monocyclam AMD3465 und seine Pharmakokinetik	66
5.4	AMD3465 Behandlung reduziert Neointimafläche und neointimalen SMC-Gehalt nach ACC-Verletzung in ApoE^{-/-}-Mäusen	68
5.5	AMD3465 inhibiert initiale Sca1⁺/lin⁻ Zellenmobilisierung und neointimale Zellproliferation nach Gefäßverletzung	69
5.6	SDF-1α-Auswirkungen auf Plaquestabilität und Plaqueeigenschaften unter AMD3465-Behandlung	70
5.7	Reendothelialisierung wurde durch AMD3465-Behandlung nicht beeinflusst	71
5.8	Aussichten und klinische Relevanz	72
6	Zusammenfassung	74
7	Referenzen	78

8	Abkürzungsverzeichnis	94
9	Danksagung	97
10	Publikationen, Vorträge und Poster	98
11	Lebenslauf	99

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die koronare Herzerkrankung (KHK) sind mit Abstand die häufigsten Todesursachen in der westlichen Hemisphäre, weit häufiger als z.B. maligne Tumore. Nicht weniger wichtig ist die Auswirkung kardiovaskulärer Erkrankungen auf die Morbidität. Allein in den USA entstehen der Volkswirtschaft jährlich etwa 280 Mrd. Dollar an Kosten für medizinische Ausgaben und Produktivitätsausfälle. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht in ihrer Liste der Hauptursachen für Erwerbsunfähigkeit und Invalidität davon aus, dass im Jahr 2020 die KHK die erst-häufigste Ursache für Invalidität sein wird. Angesichts dieser Zahlen wird mittlerweile von einer entstehenden Pandemie der kardiovaskulären Erkrankungen gesprochen.^{1,2}

Atherosklerose ist die Hauptursache dieser Erkrankungen und ihre Pathogenese wird im Rahmen der response-to-injury-Hypothese als chronischer Entzündungsprozess verstanden welcher je nach Stadium zur Ausbildung der charakteristischen Plaquetypen führt.^{3,4,5} Kommt es durch atherosklerotische Plaques zu einer Stenosierung der Arterie von über 70%, kann dies eine kritische Reduktion des Blutflusses zur Folge haben, welche sich typischer Weise in den klinischen Symptomen der Angina pectoris manifestiert. Akute koronare Syndrome (instabile Angina pectoris, Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod) hingegen werden durch die Ruptur von kleineren Plaques verursacht und anschließende Verlegung des Gefäßes durch einen Thrombus (< 50% Stenose).³

Pathogenetisch können zwei Formen der Atherosklerose unterschieden werden, eine native und eine akzelerierte Atherosklerose. Tabelle 1 und die nächsten Kapitel geben einen Überblick über die wesentlichen Unterschiede.

1.1 Native Atherosklerose

Die Endothelfunktionsstörung wird als initiales Ereignis in der Pathogenese der nativen Atherosklerose angesehen.^{3,5,6}

Mögliche Ursachen der Endotheldysfunktion sind chronische Schädigungen wie erhöhter low density lipoprotein (LDL)-Spiegel und modifiziertes LDL sowie freie Radikale. Andere Auslöser der Ausbildung atherosklerotischen Plaques können morphologische Schädigungen durch Trauma, biochemische Schädigungen durch bakterielle Toxine, Angriff durch Viren oder Antigen-Antikörper-Reaktionen, Ablagerung von Immunkomplexen sowie biophysikalische Verletzungen auf molekularer Ebene darstellen.³ Die Endotheldysfunktion bewirkt eine vermehrte Ablagerung der Lipoproteine v.a. von LDL in der Intima und deren anschließende Modifizierung durch Oxidation.^{7,8} So verändertes oxidiertes-LDL stellt einen Entzündungsreiz dar und leitet somit den zweiten Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose ein: die Bildung sogenannter „fatty streaks“. Dieser Prozess ist durch die Leukozytenrekrutierung, v.a. die von Monozyten und Lymphozyten, gekennzeichnet und kann auch bereits bei jungen Menschen beobachtet werden.⁹ Dies geschieht über eine Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen, wie z. B. P-Selektin, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Eingewandert in die Intimaregion differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen und werden durch die Aufnahme von Lipoproteinpartikeln schließlich in lipidbeladene Schaumzellen umgewandelt. Die Phagozyten setzen Zytokine frei, welche die Proliferation von glatten Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC) und die Produktion von extrazellulärer Matrix stimulieren.⁸ Bei der weiteren Entwicklung der Läsion kommt es zum Absterben von Schaumzellen, wodurch der lipidreiche nekrotische Kern entsteht.⁸ Diese Prozesse führen über einen Zeitraum von Jahrzehnten zur Bildung von atherosklerotischen Plaques und unter Umständen zur Stenosierung des Gefäßlumens mit entsprechender Symptomatik.

1.2 Akzelerierte Atherosklerose

Die native und akzelerierte Atherosklerose teilen sich nach der response-to-injury-Hypothese viele ätiologische Gemeinsamkeiten (Tabelle 1). Die akzelerierte Arteriosklerose findet man am häufigsten als Restenose bei der erneuten Verengung nach einer perkutanen Intervention, aber auch bei Transplantatvaskulopathie oder nach Koronararterien-Bypass, v.a. mit venösen Bypass-Gefäßen.⁶

Die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) oder Implantation einer Gefäßstütze aus Metall (Stent) sind die Methoden zur Behandlung von chronisch stenosierten Koronargefäßen und akuten thrombotischen Verschlüssen.^{6,10} Hierbei wird unter Röntgenkontrolle ein Katheter an die betroffene Stelle vorgeschoben. Der verwendete Katheter besitzt an der Spitze einen länglichen Ballon, der mit Überdruck aufgeblasen werden kann. Anschließend wird ein Stent implantiert. Die häufigste Komplikation bzw. Limitierung dieses Verfahrens stellt die erneute Verengung (Rezidiv- oder Restenose) der aufgedehnten Arterie nach einer perkutanen Intervention dar.^{11,12}

Der akzelerierten Arteriosklerose liegt eine akute oder subakute Gefäßverletzung zugrunde, die neben einer endothelialen Denudation auch mit einer Schädigung der Media einhergehen kann (Tabelle 1).⁶ Durch die intimale Ansammlung von SMC und Leukozyten kommt es zur Ausbildung einer Neointima, die zu einer vaskulären Stenosierung führen kann. So kann in ca. 50% der Patienten nach alleiniger Ballonangioplastie angiographisch eine Restenose nachgewiesen werden. Bei etwa der Hälfte der Patienten entwickeln sich klinische Zeichen einer myokardialen Minderperfusion, wodurch eine erneute Revaskularisation des betroffenen Gefäßes notwendig wird.¹¹

	native Atherosklerose	akzelerierte Arteriosklerose
Verletzung	Endotheliale Dysfunktion	Endotheliale Denudation ± Mediaverletzung
Thrombozyten	+	+++
Monozyten	+++	+
SMCs	+	+++
Frühphase	Lipidablagerung, Monozyteninfiltration	Thrombozytenadhäsion, neointimale SMCs
Verlauf	Jahrzehnte	Monate bis wenige Jahre

Tabelle 1: Unterschiede zwischen der nativen Atherosklerose und der akzelerierten Arteriosklerose.⁶

1.3 Restenose und Neointimaformation

Die Restenose wird als überschießender Wundheilungsprozess der Arterienwand und als Reaktion auf die mechanische Verletzung aufgefasst.¹³ Im Durchschnitt beträgt die Rate an angiographisch nachweisbaren Restenosen nach alleiniger Ballonangioplastie ca. 50 %. Etwa die Hälfte der Patienten mit angiographisch gesicherter Restenose entwickeln auch klinische Zeichen der Minderperfusion, wodurch eine erneute Revaskularisation des entsprechenden Blutgefäßes notwendig wird.¹¹

Zwei wesentliche Faktoren führen bei der Restenose zur Lumenreduktion: die Neointimabildung und das negative Gefäßremodeling.^{5,14}

Während das negative Remodeling der arteriellen Gefäßwand nach PTCA für einen Teil des Lumenverlustes verantwortlich ist, sind über 90% des Lumenverlustes nach Stentimplantation auf die Neointimabildung zurückzuführen.^{15,16} Histologisch besteht die humane Neointima überwiegend aus SMC, Makrophagen und extrazellulärer Matrix.¹⁷

Die zelluläre Reaktion auf eine mechanische Gefäßschädigung, die zur Neointimabildung führt lässt sich in vier Phasen unterteilen:¹⁸

Die mechanische Phase, die durch frühes elastisches Zurückspringen als Folge der mechanischen Ausdehnung des Gefäßes gekennzeichnet ist.¹⁸

Die thrombotische Phase, während der es zu Thromben infolge lokaler Blutungen und Thrombose kommt.¹⁸

Die proliferative Phase, bei der die neointimale Hyperplasie, aufgrund der Proliferation und Migration der medialen und intimalen vaskulären SMC (VSMC) nach der Verletzung stattfindet.¹⁸

Die Phase des Remodelings, eine pathologische Anpassung, die eine chronische und schrittweise Umwandlung des Zell- und Proteingehalts in der Media und Adventitia beinhaltet. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen und zu einer Veränderung des Phänotyps der VSMC von einem „kontraktilen“ zu einem „synthetisierenden“ Typ.¹⁸

Durch die Dilatation und die Stentimplantation kommt es an der Stelle der Stenose einerseits zu einer Kompression der atherosklerotischen Plaque und zur Dehnung der Gefäßwand aber auch zu Einrissen der Plaque und der inneren Gefäßwand. Diese Verletzung und die Anwesenheit eines metallischen Fremdkörpers im Gefäß führen zur Auslösung verschiedener Prozesse. An erster Stelle ist die Exposition thrombogener Faktoren wie Kollagen oder Gewebefaktoren, welche in der frühen Phase zur Thrombozytenaggregation und einer Ansammlung von Fibrin und Erythrozyten führen.^{17,19} Charakteristisch für die akute Frühphase nach Gefäßverletzung ist außerdem eine sehr hohe Rate der Apoptose von medialen SMCs.²⁰ Danach folgt eine massive Infiltration von Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten) und eine Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β) aus Makrophagen, Thrombozyten, Endothelzellen, SMC und Fibroblasten, die zur Aktivierung und Proliferation von SMC führen.^{21,22} PDGF wird in den Thrombozyten gespeichert und bei deren Aktivierung freigesetzt. PDGF stimuliert die Zellteilung und die Migration SMC in vitro.⁹ Ferner führte die Inhibierung von PDGF durch einen blockierenden Antikörper zu einer Reduktion der Neointimabildung.²³ Neben PDGF setzen aktivierte Thrombozyten noch andere Wachstumsfaktoren frei, wie den

epidermal growth factor (EGF) und Thrombin, welche auf SMC mitogen wirken.¹⁸ Zur Reaktion auf eine Verletzung durch Stent oder PTCA gehört auch eine Hyperproliferation von SMC⁶ und die gesteigerte Produktion von Matrix-metalloproteinasen (MMP), die zur Reorganisation der extrazellulären Matrix beitragen. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass insbesondere erhöhte MMP-2 und MMP-9 Serumkonzentrationen nach erfolgter PTCA in KHK-Patienten mit dem Risiko für eine Restenose assoziiert waren.^{24,25,26}

Verschiedene Studien ergaben Hinweise dafür, dass eine intimale Entzündungsreaktion in der Pathophysiologie der Restenose nach Stentimplantation eine Rolle spielt. Auch an menschlicher Neointima konnte die Infiltration mit inflammatorischen Zellen nachgewiesen werden. So wird eine frühe Infiltration durch neutrophile Granulozyten beschrieben, die sich jedoch innerhalb der ersten Tage nach dem Eingriff zurückbildet.²⁷ Darüber hinaus lässt sich eine neointimale Infiltration von chronisch-entzündlichen Zellen, wie Lymphozyten und Makrophagen, sowohl in der Frühphase als auch nach mehr als sechs Monaten nach Stentimplantation beobachten.²⁸ Das Ausmaß dieser Entzündungsreaktion korreliert mit der Schwere der Gefäßverletzung, insbesondere mit der Verletzung der Media. Stents, die sich in der Nähe einer Mediaverletzung befinden oder die den Lipidkern des atherosklerotischen Plaques durchdringen, zeigen eine stärkere Infiltration mit inflammatorischen Zellen im Vergleich mit Stents, die nur Kontakt zum fibrösen Plaque haben.²⁹ Die Intensität der Gefäßverletzung und die dadurch induzierten Entzündungsreaktion korreliert mit der Dicke der Neointima.²⁸ Es wurde gezeigt, dass die Verletzung der Media durch die Stentimplantation und das Durchdringen des Lipidkerns des atherosklerotischen Plaques eine chronische Entzündungsreaktion auslöst, die mit einer gesteigerten Neointimabildung und einer höheren Restenoserate assoziiert ist. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die durch die Gefäßverletzung induzierte Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle bei der Neointimabildung spielt.

1.4 Herkunft der neointimalen SMC

Die Akkumulation von SMC in der Neointima der verletzten Gefäßwand ist der entscheidende Faktor bei der Entstehung der Restenose. Bisher ging man von der Hypothese aus, dass die neointimalen SMC sowohl bei der nativen Atherosklerose als auch bei der akzelerierten Arteriosklerose ausschließlich lokal aus der Media der Arterienwand einwandern und in der Intima proliferieren.³⁰ Inzwischen haben mehrere Studien an Tiermodellen und am Menschen gezeigt, dass ein großer Teil der intimalen SMC aus einem adulten Stammzellpool des Knochenmarks stammt und diese Vorläuferzellen von SMC (smooth muscle progenitor cells, SPC) permanent im peripheren Blut zirkulieren.³¹⁻³⁴

Im Versuchsmodell der Transplantatvaskulopathie bekamen die Versuchstiere zusätzlich eine Knochenmarkstransplantation mit β -Galactosidase- oder grün fluoreszierendem Protein- (GFP)-exprimierenden Stammzellen.^{31,35} In der dadurch entstandenen Neointima konnte anschließend gezeigt werden, dass ein Großteil der neointimalen SMC der Empfängertiere β -Galactosidase bzw. GFP exprimierten und somit aus dem Knochenmark abstammen.^{31,35} In einer weiteren Studie wurden Wildtyp-Mäuse mit β -Galactosidase exprimierenden Knochenmarkszellen transplantiert und eine Drahtverletzung der A. femoralis durchgeführt. Die Neointima bestand zu 63% und die Media zu 45% aus β -Galactosidase-positiven Zellen, von denen ein Teil den Marker für SMCs α -smooth muscle actin (α -SMA) und ein Teil den Endothelzellmarker CD31 exprimierte.³¹ Um den genauen Ursprung der SPC zu bestimmen wurde spezifisch aus dem heterogenen Knochenmark β -Galactosidase-exprimierende hämatopoetische Stammzellen charakterisiert durch die Oberflächenmarker c-Kit⁺ und Sca-1⁺ (c-Kit-Rezeptor für den Stammzellfaktor; Sca-1-stem cell antigen-1) sowie dem Fehlen hämatopoetischer Differenzierungsmarker (Lineage-Marker, lin⁻) isoliert und in knochenmarksdepletierte Empfängermäuse transplantiert. Nach Drahtverletzung der A. femoralis bestand die Neointima zu 43% aus β -Galactosidase-positiven Zellen von denen wiederum 73% auch α -SMA exprimierten.³¹ In vitro differenzierten sich diese c-Kit⁺Sca-1⁺/lin⁻ Zellen in Kokultur mit vaskulären SMC ebenfalls zu SMC-ähnlichen Zellen.³¹ Ähnliches wurde für die Zellen mit Sca-1⁺/lin⁻ Eigenschaften gefunden. Aus dem peripheren Blut von männlichen Mäusen isolierte Sca-1⁺/lin⁻ Zellen, die unmittelbar nach der

endothelialen Denudation der A. carotis communis (CCA, ACC) in Apolipoprotein E defizienten (ApoE^{-/-}) weiblichen Mäusen injiziert wurden, differenzierten in der Neointima in SMC. Dies konnte durch den Nachweis von Y-Chromosom in α -SMA- bzw. smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC)-exprimierenden Zellen gezeigt werden.³⁶

Einen Einfluss auf die Rekrutierung von SPC aus dem Knochenmark scheint auch das verwendete Modell der mechanischen Gefäßverletzung zu haben. Die von Tanaka et al. publizierten Befunde legen die Vermutung nahe, dass die neointimale Rekrutierung von SPC nach Drahtverletzung häufiger ist als nach periarterieller Cuff-Anlage oder Gefäßligatur.^{37,38} Dies korreliert mit der Apoptoserate in der verletzten Gefäßwand, so dass die Schwere der Verletzung mit dem Ausmaß der SPC Rekrutierung assoziiert zu sein scheint. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei einer extensiven Verletzung die ortsansässigen VSMC für eine Reparatur nicht ausreichen, weswegen zirkulierende SPC von anderen Quellen benötigt werden.³⁹

Außer bei den verschiedenen Formen der akzelerierten Arteriosklerose, wurde auch bei der chronisch verlaufenden nativen Atherosklerose die Herkunft der SMC in den Plaques untersucht. In ApoE^{-/-} Mäusen nach Knochenmarkstransplantation waren unter einer achtwöchigen cholesterinreichen Diät atherosklerotische Läsionen mit SMC entstanden, die zu etwa 50% aus dem Knochenmark stammten.³¹ In atherosklerotischen Läsionen der Koronararterien von Patienten nach Knochenmarkstransplantation, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil der SMCs aus dem Knochenmark stammt.³³

Von zentraler Bedeutung bei der SPC-vermittelten vaskulären Wundheilung ist die Frage durch welche Signale die Mobilisierung und Rekrutierung in die verletzte Gefäßwand gesteuert wird. In diesem Zusammenhang haben das CXC Chemokin stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α , CXCL12) und dessen Rezeptor Chemokine CXC-Rezeptor 4 (CXCR4) eine wichtige Funktion.^{36,40}

1.5 Chemokin SDF-1 α - und CXCR4-Biologie

SDF-1 α /CXCL12 (preB-cell growth-stimulating factor, PBSF) gehört zu einer Gruppe von strukturell verwandten Proteinen, die eine chemotaktische Aktivität v.a. für hämatopoetische Zellen besitzen und deshalb als chemotaktische Zytokine oder kurz Chemokine bezeichnet werden.⁴¹ Die Gruppe der Chemokine wird entsprechend der Position der ersten zwei eng benachbarten Cysteine in der Aminosäuresequenz in CXC-, CC-, CX3C- und C-Chemokine unterschieden. Erstmals wurde SDF-1 α als ein von stromalen Zellen des Knochenmarks sezerniertes Protein identifiziert.^{42,43} Obwohl die Primärstruktur des 68 Aminosäuren langen SDF-1 α es als CXC-Chemokin ausweist, unterscheidet sich die Aminosäuresequenz des SDF-1 α ähnlich stark von CC- als auch von CXC-Chemokinen (22% bzw. 27% Homologie).⁴⁴ Im Vergleich zu den Chemokinen Interleukin-8 (IL-8) oder monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) besitzt SDF-1 α eine deutliche höhere Bindungsaffinität zu Heparin.⁴⁴ Der N-Terminus des SDF-1 α , der unmittelbar dem CXC Motiv vorangeht, ist notwendig für die Rezeptoraktivierung und -bindung. Auffallend ist ferner die hohe Sequenzhomologie des SDF-1 α zwischen verschiedenen Spezies. So unterscheiden sich humanes und murines SDF-1 α nur durch eine Aminosäure an Position 18 (Valin im humanen und Isoleucin im murinen Protein).⁴⁵

Die Effekte von Chemokinen werden durch eine Familie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranalen Domänen vermittelt.⁴⁶

Lange Zeit war nur CXCR4 als SDF-1 α Rezeptor bekannt, der wiederum als einziger Chemokinrezeptor mit SDF-1 α nur einen Liganden besitzt.⁴⁴ Inzwischen ist mit CXCR7/RDC1/Cmkor-1 ein weiterer Rezeptor für SDF-1 α beschrieben, dessen Funktion allerdings noch nicht genau geklärt ist.^{47,48}

CXCR4 wurde primär aus Leukozyten geklont⁴⁹ und funktionell als essentieller Kofaktor der Infektion von CD4⁺-T-Zellen durch T-Zell-tropische humane immundefizienz Viren 1 (HIV) und HIV2 erkannt.^{50,51} Die Bindung von SDF-1 an CXCR4 führt über eine Dimerisierung des Rezeptors⁵² und der Bindung inhibitorischer G-Proteine⁵³ zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Komponenten der focal adhesions⁵⁴, der extracellular signal regulated kinases-1 und -2 (ERK-1 und ERK-2)⁵⁵, der Phospholipase C- γ (PLC- γ), der Proteinkinase C (PKC) sowie der Phosphoinositol 3-

Kinase (PI3-K)⁵⁶ zur Folge haben. Die Inaktivierung findet nach Ligandenbindung durch Endozytose und überwiegend lysosomalen Abbau des Rezeptors statt.^{57,58}

Chemokine steuern die Migration und das Homing von Leukozyten im Rahmen der homöostatischen Rezirkulation und bei inflammatorischen Prozessen. Der chemotaktische Effekt der Chemokine auf Leukozyten bewirkt nicht nur eine Veränderung des Zytoskeletts der Leukozyten, sondern induziert auch die Aktivierung von leukozytären Integrinen, wodurch die Adhäsion an das Endothel ermöglicht wird.⁵⁹

Auf zellulärer Ebene sind Chemokine entscheidend am adaptiven Gefäßumbau (vaskuläres Remodeling) beteiligt, indem sie die Rekrutierung von mononukleären Zellen in die verletzte Region steuern und residente VSMC aktivieren.^{60,61}

Das CXC Chemokin SDF-1 α und dessen Rezeptor CXCR4 sind wesentlich für die Homöostase von Stammzellen im Knochenmark und der embryonalen Arteriogenese.⁶² Die Aktivierung von CXCR4 durch SDF-1 α führt zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von hämatopoetischen Stammzellen (HSC), welches eine deutlich gesteigerte Homing-Kapazität und Proliferation der HSC induziert.^{63,64}

1.6 Bedeutung von SDF-1 α und seinen Rezeptors CXCR4 bei atherosklerotischen Erkrankungen

Während in Arterien ohne atherosklerotische Veränderungen kein SDF-1 α nachweisbar ist, wird SDF-1 α in humanen atherosklerotischen Plaques von SMC, Endothelzellen und Makrophagen exprimiert.⁶⁵ Eine mögliche funktionelle Beteiligung an atherothrombotischen Prozessen wurde aus der Tatsache abgeleitet, dass SDF-1 α effektiv über CXCR4 die Thrombozytenaggregation und die thrombozytäre Calcium-Freisetzung induziert. Der SDF-1 α Effekt auf die Thrombozytenaggregation ist abhängig von der Prostanoid-Synthese und der Aktivierung von Tyrosinkinasen.⁶⁵ Bei den Patienten mit instabiler Angina Pectoris zeigte sich eine deutliche Reduktion der SDF-1 α -Konzentration im Plasma im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris oder gesunden Probanden. Dies ging mit einer verminderten CXCR4

Expression auf Monozyten und CD3⁺ T-Lymphozyten einher. Ein antiinflammatorischer Effekt von SDF-1 α im Rahmen der Koronarsklerose wurde ferner aus dem Befund gefolgert, dass SDF-1 α die Expression und Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen, wie MCP-1 und IL-8 aus mononukleären Zellen von Patienten mit instabiler Angina pectoris vermindert.⁶⁶

Die diät-induzierte Atherosklerose in Apo-E^{-/-} Mäusen wurde mit einer langfristigen pharmakologischen Inhibition von CXCR4 aggraviert.⁶⁷ Hierbei kam es zu einer gesteigerten Mobilisierung von Leukozyten, insbesondere der neutrophilen Granulozyten, und nachfolgender Rekrutierung in atherosklerotische Plaques. Die neutrophilen Granulozyten sezernieren potente reactive oxygen species (ROS, bzw. Sauerstoffradikale), geben verschiedene proteolytische Enzyme ab wie z.B. Elastase und Myeloperoksidase (MPO), wodurch Infektionen bekämpft werden, aber auch Degradation und Zerstörung des umgebenden Gewebes erfolgen kann. In dieser Studie führte die Neutrophilenrekrutierung zur Exazerbation und Destabilisierung der atherosklerotischen Plaques in Apo-E^{-/-} Mäusen mit pharmkologischer CXCR4 Inhibition. Im Gegensatz dazu konnte die Plaqueentstehung an der Aortenwurzel der ApoE^{-/-} Mäuse durch Neutrophilendepletion mit einem monoklonalen Antikörper (anti PMN-Ab) vermindert werden. Vielmehr konnte dadurch die Exacerbation der Plaques in der Gruppe mit CXCR4-Inhibition aufgehoben werden. Dadurch konnte die entscheidende Rolle von CXCR4/SDF-1 α -Achse in der Homeostase und Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten und deren ausschlaggebenden Rolle in der Atherogenese gezeigt werden.⁶⁷

1.7 Rolle der SDF-1 α / CXCR4 Achse bei der Neointimabildung

SDF-1 α wird in atherosklerotischen Plaques und in neointimalen Läsionen nach einer Gefäßverletzung gesteigert exprimiert und spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung und lokalen Rekrutierung von SPC.^{36,40,68} Im Tiermodell steigert eine mechanische Gefäßverletzung abhängig vom Schweregrad die SDF-1 α Expression in medialen SMC.³⁷ Zusätzlich gibt es Hinweise dafür, dass die gesteigerte Expression von SDF-1 α , MCP-1 und vascular endothelial growth factor (VEGF) in der Gefäßwand mit der SPC-Rekrutierung korreliert.³⁷

Einen Tag nach einer Gefäßverletzung kommt es zu einem transienten Anstieg der Plasmakonzentration von SDF-1 α . Hierbei wird der SDF-1 α -Gradient zwischen Knochenmark und der Zirkulation verändert, wodurch die SPC in der Zirkulation mobilisiert werden.³⁶ Die SPC werden durch SDF-1 α und aktivierte Thrombozyten in die verletzte Gefäßwand rekrutiert und tragen dadurch zur Neointimabildung bei.^{36,38} Bei der Transplantatvaskulopathie konnte ebenfalls eine gesteigerte SDF-1 α Expression sowohl im Tiermodell als auch in Patienten nach Herztransplantation nachgewiesen werden.^{69,70} Eine Hemmung von SDF-1 α durch blockierende Antikörper bzw. eine Deletion des SDF-1 α -Rezeptors CXCR4 in Knochenmarkszellen inhibierte die neointimale Hyperplasie und die Rekrutierung von SPC im experimentellen Restenose- und Transplantatvaskulopathie-Modell.^{37,40,69}

Als wichtiges Bindeglied zwischen der Gefäßverletzung und der SDF-1 α /CXCR4-vermittelten SPC-Rekrutierung wurde die Apoptose der medialen SMC unmittelbar nach der Verletzung identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass die SPC-vermittelte Wundheilung von der SDF-1 α /CXCR4 Achse durch die Apoptose nach Gefäßverletzung induziert wird.⁴⁰ Ferner geht die Hemmung der Caspaseaktivität mit einer verminderten SDF-1 α Expression einher.⁴⁰ Die apoptotischen SMC setzen apoptotische Mikrovesikel („apoptotic bodies“) frei, die die Sekretion von SDF-1 α aus unverletzten medialen Zellen in vitro induzieren.⁴⁰ Die höchste Apoptoserate und damit SDF-1 α Expression wird, im Vergleich mit der Karotidenligatur oder Cuff-Anlage, durch eine mechanische Gefäßverletzung hervorgerufen.³⁷

Im Ischämiemodell wird die SDF-1 α Expression und damit die Rekrutierung von Vorläuferzellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) und dessen Interaktion mit Bindungsstellen im SDF-1 α Promoter gesteuert.⁷¹ Die Aktivität von HIF-1 α wird jedoch nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Sauerstoffradikale gesteigert.⁷² In SMC kommt es z.B. durch eine Behandlung mit Thrombin, PDGF, TGF- β oder Angiotensin II zu einer Aktivitätssteigerung und vermehrten messenger-RNA (mRNA) Expression von HIF-1 α .^{73,74} Auch proinflammatorische Signaltransduktionswege, wie z. B. der Transkriptionsfaktor nuclear factor- κ B (NF- κ B), verstärken im Rahmen der Wundheilung die HIF-1 α Aktivierung.^{75,76} Nach einer Gefäßverletzung im Mausmodell der akzelerierten Atherosklerose⁷⁷ kommt es ebenfalls zu einer Hochregulierung von HIF-1 α , welches eine vermehrte SDF-1 α -Expression zur Folge hat.⁷⁸ Eine Hemmung der HIF-1 α -Expression durch HIF-1 α -spezifische small-inhibiting RNA (siRNA)

verringerte die SDF-1 α -Expression und neointimale Fläche nach Gefäßverletzung, so dass eine direkte Kausalität zwischen HIF-1 α Expression und SDF-1 α induzierten akzelerierter Atherosklerose nachgewiesen wurde.⁷⁸

1.8 Therapeutische Optionen zur Hemmung der Restenose

Die bisher einzige erfolgreiche Therapie zur Reduktion der Restenose nach einer perkutanen koronaren Intervention (PCI) konnte durch die Implantation beschichteter, Medikamente freisetzender Stents (drug eluting stents, DES) erreicht werden, die das Risiko der Restenose und damit der Reintervention deutlich reduzieren.⁷⁹ Bei den derzeit gebräuchlichsten Typen wird ein in einer Polymer-Beschichtung gebundener antiproliferativer Wirkstoff kontinuierlich vom Stent am Ort der Gefäßverletzung über Wochen freigesetzt. In der klinischen Praxis werden häufig zwei Substanzen zur Stentbeschichtung verwendet: Rapamycin (Sirolimus) und Paclitaxel. Beide wirken durch eine Interaktion mit bestimmten Zellzyklusregulatoren antiproliferativ.^{80,81}

Die DES haben die Restenoserate auf <10% gesenkt. Trotzdem bleibt ihr Einsatz nicht risikofrei. Es gibt Hinweise, dass die Implantation eines DES eine verzögerte Reendothelisierung bewirkt, wodurch möglicherweise ein erhöhtes Risiko für v.a. spät auftretende In-Stent-Thrombosen, verbunden mit hoher Mortalität, besteht.⁸²⁻⁸⁴ Um dieses Risiko zu minimieren bedarf es einer langfristigen dualen Therapie mit den Thrombozytenaggregationshemmern Acetylsalicylsäure und Clopidogrel bzw. Ticlopidin. Dabei birgt die doppelte Hemmung der Thrombozytenfunktion ein erhöhtes Blutungsrisiko.^{85,86} Daher wäre eine Entwicklung neuer Therapieansätze zur Prävention der Restenose von Interesse, welche die Reendothelialisierung nicht hemmen und eine risikoreiche und kostenintensive kombinierte Hemmung der Thrombozytenfunktion nur für kurze Zeit bedürfen.

Eine selektive Hemmung der neointimalen Rekrutierung von SPC bzw. SMC in die verletzten Gefäßgebiete könnte eine therapeutische Alternative darstellen. Durch die Erkenntnisse der wichtigen Funktion von SDF-1 α und seines Rezeptors CXCR4 an der Neointimabildung könnte diese Achse ein alternatives therapeutisches Ziel darstellen.^{36,40} Kleinmolekulare Mono- und Bicyclame, wie AMD3465 und AMD3100,

sind potente CXCR4-Antagonisten⁸⁷, die potentiell für die medikamentöse Restenoseprävention eingesetzt werden könnten.

1.9 Nicht-Peptid-CXCR4-Antagonisten, Mono- und Bicyclame

CXCR4 ist der entscheidende Korezeptor für den Zelleintritt der sog. X4-Humanes Immundefizienz-Virus-Stämme.^{87,88} Im Kampf gegen die zunehmende Medikamentenresistenzen des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) wurde eine effektive Reduktion der HIV-Replikation durch AMD3100 beschrieben, ohne aber den genauen Wirkmechanismus zu kennen.⁸⁹ Erst die weitere Charakterisierung zeigte, dass AMD3100 ein potenter und selektiver CXCR4-Antagonist ist.⁹⁰ AMD3100 ist ein Bicyclam (Abbildung 1) und besitzt eine schlechte orale Bioverfügbarkeit durch die stark basische Natur des Moleküls.^{87,88}

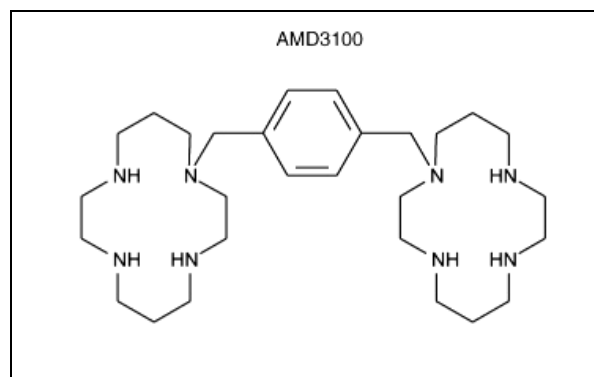


Abbildung 1: Strukturformel von AMD3100; 1,1'-[1,4-phenylenbis(methylen)]-bis-1,4,8,11-tetraazacyclo-decan.⁸⁷

Um die orale Bioverfügbarkeit von AMD3100 zu verbessern wurde das Monocyclam AMD3465 entwickelt (Abbildung 2). Sowohl AMD3100 als auch AMD3465 hemmen die Bindung des monoklonalen CXCR4-Antikörpers (Klon 12G5) und des natürlichen CXCR4-Liganden SDF-1 α mit nachfolgender Inhibition der SDF-1 α -induzierten Kalziummobilisation.⁸⁷ Im Vergleich zu AMD3100 hemmt AMD3465 die 12G5 mAb-Bindung 50-fach und die SDF-1 α -induzierte Kalziummobilisation 15-fach stärker. Beide Präparate sind spezifisch für CXCR4 und zeigen keine Interaktion mit anderen Chemokinrezeptoren.⁸⁷ Obwohl das Wegfallen der makrozyklischen Struktur nicht

zur erhofften Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit führte, konnte ein CXCR4 Antagonist mit einer verbesserten Aktivität entwickelt werden.^{87,88}

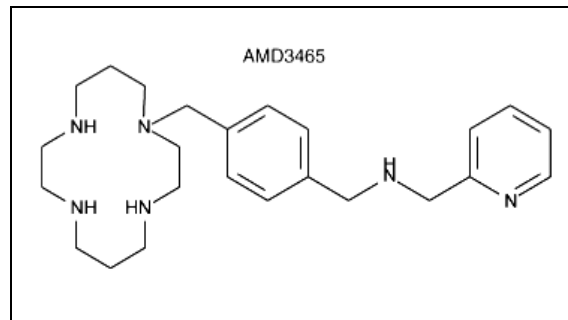


Abbildung 2: AMD3465; N-[1,4,8,11-tetrazacyclotetradecanyl-1,4-phenylenbis(methylen)]-2-(aminomethyl)-pyridin.⁸⁷

Außer einer anti-HIV-Wirksamkeit zeigen die Bicyclame eine gute mobilisierende Eigenschaft auf HSC, welche mit dem AMD3100 klinisch erprobt wurde.^{91,92} Im Dezember 2008 erfolgte die Zulassung des AMD3100, Freiname Plerixafor, durch die amerikanische Federal Drug Agency (FDA).⁹³ Die Zulassung beschränkt sich auf Freisetzung von HSC aus dem Knochenmark in die Blutbahn zum Zweck der Stammzellisolierung für eine autologe Stammzelltransplantation bei Patienten mit multiplen Myelom oder Non-Hodgkin-Lymphom in Kombination mit Granulozytenkolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF).⁹⁴

Im Hinblick auf die instrumentale Rolle der SDF-1 α /CXCR4-Achse bei der Entstehung der neointimalen Formation^{36,40} könnten der selektive CXCR4-Antagonismus der Mono- und Bicyclame einen neuen therapeutischen Ansatz zur Hemmung der Restenose nach intensiver Gefäßverletzung darstellen.

Im Tiermodell führte eine Behandlung mit AMD3100 zu einer signifikanten Hemmung der hyperplastischen Neointimabildung nach Induktion der Neointima durch Verletzung der Femoralarterie und M-CSF-Gabe (macrophage colony stimulating factor).⁹⁵

Die Wirkung von AMD3465, einem noch potenteren CXCR4-Antagonisten, auf die akzelerierte Atherosklerose wurde bisher noch nicht untersucht und wird in dieser Promotionsarbeit, am Modell der akzelerierten Atherosklerose nach endothelialer Denudation der A. carotis communis in hyperlipidämischen Apo-E^{-/-}-Mäusen, zum ersten Mal analysiert.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde die Fragestellung untersucht, ob eine pharmakologische Therapie mit dem kleinmolekularen CXCR4-Antagonisten AMD3465 in einem Mausmodell der Restenose die Neointimabildung durch eine selektive Hemmung der SMC Akkumulation, ohne die Reendothelialisierung zu beeinflussen, reduziert und damit eine klinische Option zur Prävention der Restenose darstellen könnte.

Ferner wurde der Einfluss von AMD3465 auf die inflammatorische Zellrekrutierung nach mechanischer Gefäßverletzung und die Zellproliferation in der Neointima untersucht. Entsprechend der Vorstellung, dass AMD3465 spezifisch die SMC-Akkumulation in der Neointima hemmt, wurde die Hypothese verfolgt, dass keine Änderung des Makrophagenanteils an den neointimalen Zellen durch die AMD3465 Behandlung auftritt. Die SDF-1-vermittelte Mobilisierung von Sca-1⁺/Lin⁻ SPC nach Drahtverletzung der A. carotis ist wesentlich für die neointimale SMC Akkumulation. Es wurde deshalb die Auswirkung einer AMD3465-vermittelten CXCR4 Blockade auf den Anteil der zirkulierenden SPC nach Gefäßverletzung analysiert.

3 Methoden und Material

3.1 Antikörper

Anti- α -smooth-muscle Aktin, monoklonaler AK, Klon 1A4, Klasse IgG2a Kappa, Spezies Maus, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland

Anti-Maus-Mac-2, monoklonaler AK, Klon M3/38, Klasse IgG2a, Spezies Ratte, Fa. Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada

Anti-VE-Cadherin, polyklonaler Ak, Klasse IgG, Spezies Ziege, Fa. Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.

Anti-Ki67, monoklonaler AK, Klon SP6, Klasse IgG, Spezies Hase, Fa. Novus Biologicals, Littleton, CO, U.S.A.

Biotinylierter Anti-Ratte-IgG (H+L), Klasse IgG, Spezies Hase, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A

Biotinylierter Anti-Ziege-IgG, Klasse IgG, Spezies Hase, Fa. Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.

Biotinylierter Anti-Kaninchen-IgG, Klasse IgG, Spezies Schaf, Fa. Serotec, NC, U.S.A
Normal Kaninchen-IgG AK, Klasse IgG, negative Kontrolle, Fa. Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.

Normal Kaninchen-IgG AK, Klasse IgG, negative Kontrolle, Fa. Novus Biologicals, Littleton, CO, U.S.A.

Biotin-konjugierter Maus Lineage Panel, Klasse IgG, Fa. BD Pharmingen, Cat. 559971

R-Phycoerythrin-konjugierter ratte-anti-maus Ly-6A/E (Sca-1) monoklonaler AK, Klasse IgG2a, Spezies Ratte, Fa. BD-Pharmingen

3.2 Reagenzien

Alcian blau 8 GX, Sigma A5628

Alkohol 70%, 96%, 100%, Apotheke Innenstadt Universität München

Antisedan®-Injektionslösung

BD-FACSFlow™, BD-Biosciences

BD FACS-Lysing Solution 10x, BD-Biosciences

Bovine Serum Albumine, Fraktion V>96%, Sigma

Brilliant-Crocein Scarlet Fluka, 27970, C.I. 27290

Cutasept F

DAB Substrate Kit Peroxidase SK 4100, Vector® Labs

Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, Roth

Dormitor®-Injektionslösung

Eisen(III)-Chlorid Merck, 8.03945.0500

FITC-Streptavidin (Vector Labs)

Impress Universal Reagent Peroxidase MP 7500

Iod, Sigma

Hämalaunlösung (nach P.Mayer, Romes § 648)

Hämatoxylin Sigma, H3136

Heparin-Natrium 25000 I.E. Fa. Braun

Kaliumcarbonat, Merck

Kaliumhydrogenphosphat, Roth

Kaliumiodid, Sigma

Ketavet®-Injektionslösung

NaCl-Lösung 0,9% 100 ml, Fa. Braun

Natriumchlorid, Merck

Natrium-Hydrogencarbonat, Merck

Paraformaldehyd, reinst, Roth

Phosphorwolframsäure Hydrat, Sigma

Rabbitserum C12SA, Serotec

Saffron du Gatinais, Sigma S8381, C.I. 75100

Säurefuchsin Merck, 105231

Säure-Hämalaunlösung, nach P.Mayer, Apotheke Innenstadt Uni-München

Schafsserum

TRIS-HCl, Sigma

Tween® 20, P-7949, Sigma

Tyramide Signal Amplification TSATM-Biotin-System (Perkin Elmer®, NL700A)

Vectashield®-Einschlusslösung, Vector® Labs

Vecta Mount®-Einschlusslösung

Wasserstoffperoxid, reinst, Apotheke Innenstadt Uni-München

Xylol, Apotheke Innenstadt Uni-München

3.3 Geräte

CCD-Kamera, (KY-F75U, C-Mount), JVC

Dissektionsmikroskop, (KL 1500 LCD), Carl Zeiss

Durchlicht-Mikroskop (Leica DMRBE), Leica

Einbettautomat (Shandon Pathcentre®), Thermo Electron GmbH

FACScalibur®-Gerät

Mikrotom, Microm HM 360

Paraffinspendeautomat (Microm EC 350 Paraffin Embedding Center), Microm International GmbH

Thermoplatte (Ttempcontrol 37 analog), Carl Zeiss

Thermoschüttler (Thermomixer comfort), Eppendorf

Thermostat WTB Binder

Vortex-Genie Bender & Hobein AG

Waage OHAUS Adventurer

Watt-Mikrowelle (Severin 700), Severin

Zentrifuge Rotina 48 R, Hettich

3.4 Verbrauchsmaterialien

Alzet®-mini osmotic pump Modell 2004

Angioplastie-Führungsdraht 0.36 mm Ø, Boston Scientific
Augenschere (Nachstarschere Vannas, 85mm), Aesculap
Chirurgischer Faden (Seraflex EP2, (3/0), Serag Wiessner
Deckgläschen 18x18mm, Fa. Menzel-Gläser
Einbettkassetten, Sanowa Laborprodukte GmbH
Falcon Rundboden-Röhrchen 5 ml, BD Biosciences
Filter (110mm), Sartorius Biotech GmbH
Filterpapier, Schleicher & Schnell BioScience
Heparinisierte Einmal-Kapillarpipetten, Hirschmann Laborgeräte GmbH
Mikropinzette (Uhrmacher Typ, 0,2 mm, gebogen), Aesculap
Pipetenspitzen ep T.I.P.S. Standard 0,1-10µl, 20-300µl, 50-1000µl, Eppendorf
Reagiergefäß Easycap 1,5ml, Sarstedt
Reagiergefäß Safe-lock Tube 0,5 ml, Eppendorf
Rotilabo®-Universal-Indikatorpapier Typ Eco, Roth
SuperFrost plus® Gold Objekträger gegeben, Fa. Menzel-Gläser
Tesa-Film, Tesa AG
Wundklammern (Michel Wundklammern 7,5 x 1,75 mm), Aesculap

3.5 Anmerkung zu den Tierversuchen

Die folgenden vorgestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden bei der zuständigen Regierung von Oberbayern angezeigt und genehmigt.

3.6 Versuchsablauf

Die Abbildung 3 gibt einen Überblick über den Versuchsablauf. Die Methodik der einzelnen Untersuchungen wird in den nachfolgenden Kapiteln erläutert.

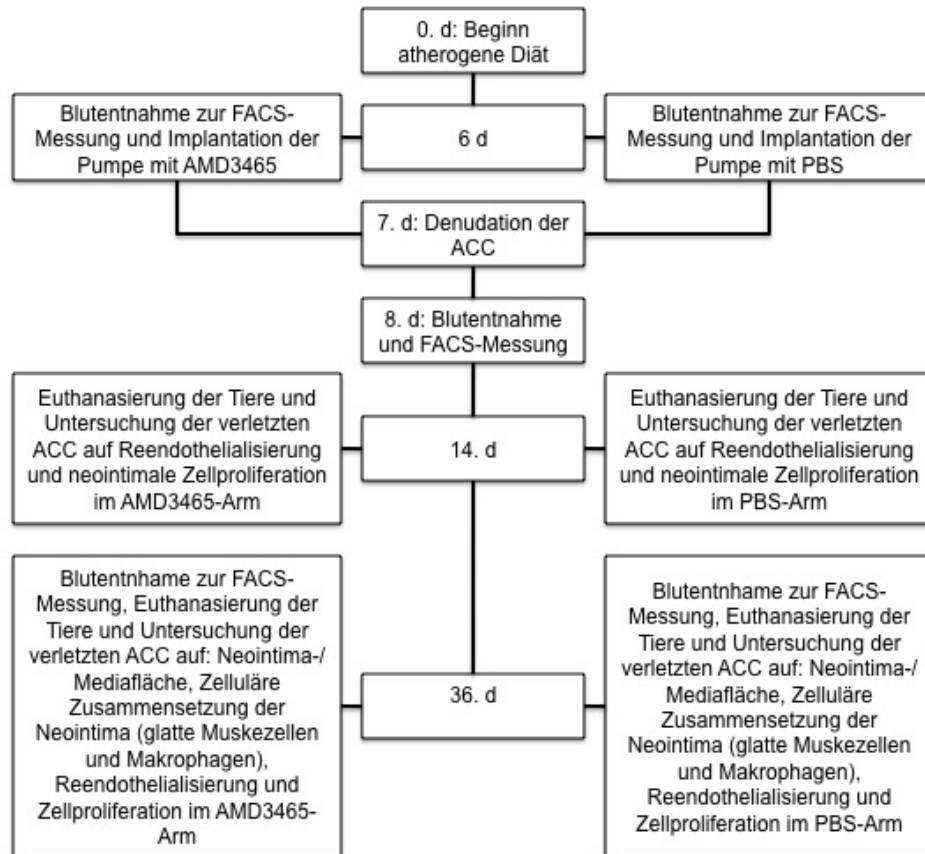


Abbildung 3: Versuchsablauf.

3.7 Versuchstiere, Tierhaltung und atherogene Diät

Die Experimente wurden ausschließlich an acht Wochen alten ApoE^{-/-} weiblichen Mäusen (genetischer Hintergrund C57BL/6) mit einem Gewicht zwischen 19-21g (Firma Charles River, Sulzfeld) durchgeführt.

Nach dem Eintreffen der Tiere wurden diese in einem geeigneten Stall untergebracht, in dem die Temperatur von 20-22°C und Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten wurde (Zentrale Versuchstierhaltung LMU, Klinikum Innenstadt, Nußbaumstr. 20, 80336 München). Maximal fünf Tiere wurden in „IVC Typ II long“ Käfige mit Wasser und Futter ad libitum gesetzt. Die Experimente wurden frühestens zehn Tage nach Lieferung der Tiere begonnen.

Eine Woche vor der Verletzung der A. carotis communis wurde eine cholesterinreiche Diät begonnen und bis zum Versuchsende weitergeführt. Das Futter beinhaltete: 21% Gesamtfett, 19,5% Casein und 0,15% Cholesterin (Fa. Sniff Mäusefutter).³⁶

Bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12h wurde darauf geachtet, Manipulationen an den Tieren immer zur gleichen Zeit durchzuführen.

3.8 Induktion der akzelerierten Atherosklerose durch endotheliale Denudation der A. carotis communis am Mausmodell

Die Gefäßverletzung der A. carotis communis (CCA)³⁶ wurde nach Anästhesierung mit Ketavet und Metedomidin (s. Kapitel 3.9) mit einem 0,36 mm Ø Führungsdraht durchgeführt. Nach Lagerung und Fixierung der Tiere auf einer Wärmeplatte (37°C) und Desinfektion wurde eine ca. 1,5 cm lange Inzision in der Medianlinie am Hals vorgenommen. Unter Auflichtmikroskopie (Dissektionsmikroskop, Fa. Zeiss) wurde nach vorsichtiger Präparation CCA mit Bifurkation, A. carotis externa (ECA) und A. carotis interna (ICA) dargestellt. Anschließend wurde die CCA proximal und die ICA distal der Bifurkation kurzfristig abgebunden und nach Ligation der ECA, kaudal dieser Ligatur das Gefäß inzidiert (Abbildung 4).

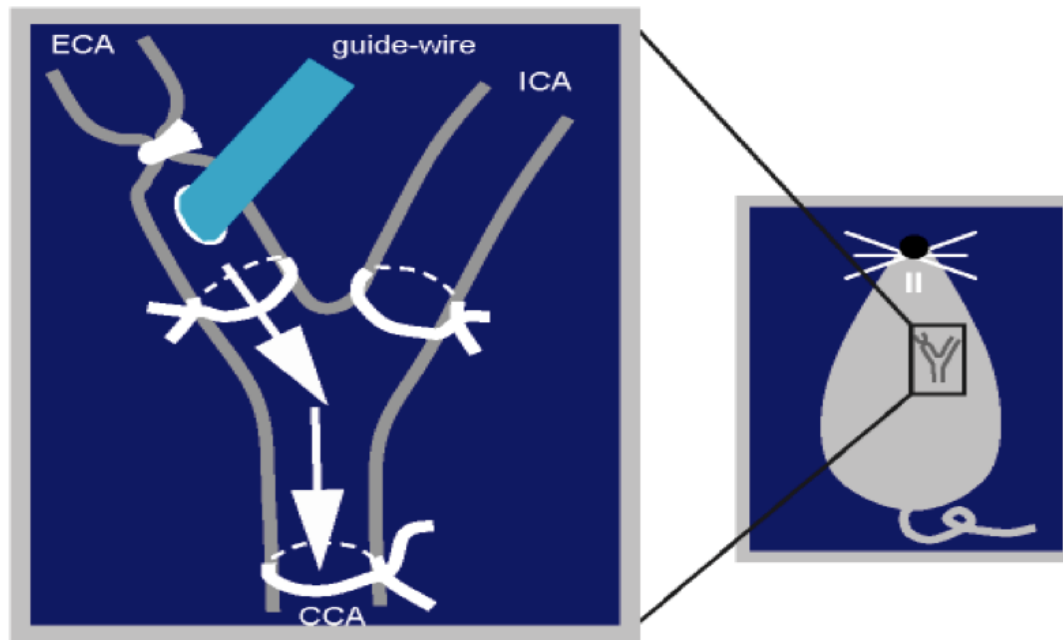


Abbildung 4: Skizze der endothelialen Denudation der CCA.³⁶

Der Führungsdraht wurde über diesen Zugang in die ECA eingeführt und etwa 7-8 mm in die CCA vorgeschoben. Durch dreimaliges Vorschieben und Zurückziehen bei gleichzeitiger Rotation wurde die luminalen Gefäßoberfläche komplett denudiert.^{96,97} Nach Entnahme des Führungsdrahts wurde die Arteriotomie durch eine Ligatur verschlossen und der Blutfluss durch Wiedereröffnung der CCA und der ICA wiederhergestellt. Die Wunde wurde dann mit Klammern verschlossen und die Mäuse nach dem Aufwachen weiter unter atherogener Diät gehalten.

Innerhalb von drei bis vier Wochen entsteht an dieser Stelle ein fortgeschrittener atherosklerotischer Plaque mit Monozyten, Schaumzellen und SMCs.^{96,97}

3.9 Anästhesie der Versuchstiere

Die Narkose wurde mit einer intraperitonealen (IP) Injektion von Metedomidin (Dormitor®) 0,3 mg/kg und Ketamin (Ketavet®) 0,6 mg/kg durchgeführt. Die Antagonisierung von Metedomidin erfolgte bei Bedarf mit Atipamezol (Antisedan®) 2,5 mg/kg IP.

3.10 AMD3465-Applikation

Um konstante Wirkspiegel von AMD3465 im Plasma zu erreichen erfolgte eine kontinuierliche Applikation über eine subkutan implantierte osmotische Minipumpe.⁹⁸

3.10.1 Osmotische Minipumpe

Die Medikamentenabgabe durch die Alzet®-Pumpe⁹⁸ (Durect Corporation, Vertrieb: Charles River, Sulzfeld) basiert auf dem Prinzip der Osmose. Außen ist die Pumpe mit einer semipermeablen Membran und im Inneren mit einem komprimierbaren nichtpermeablen Medikamentenreservoir ausgestattet. Zwischen der Membran und dem Reservoir befindet sich ein hyperosmolares Milieu. Wird die Pumpe jetzt in ein isotones Milieu (0,9% NaCl) gegeben, werden die Salzkonzentrationen osmotisch ausgeglichen. Über die semipermeable Membran kann nur das Lösungsmittel in die Pumpe diffundieren, wodurch das Medikamentenreservoir komprimiert wird und somit die Medikamentenabgabe über den sog. flow moderator (siehe Abbildung 5) erfolgt. Nach dem Starten der Pumpe (s Kapitel 3.10.2) wird je nach Modell eine konstante Pumprate erreicht. Für das Modell 2004 garantiert der Hersteller eine kontinuierliche Abgaberate von 0,25 µl/h über 28 Tage.^{98,99}

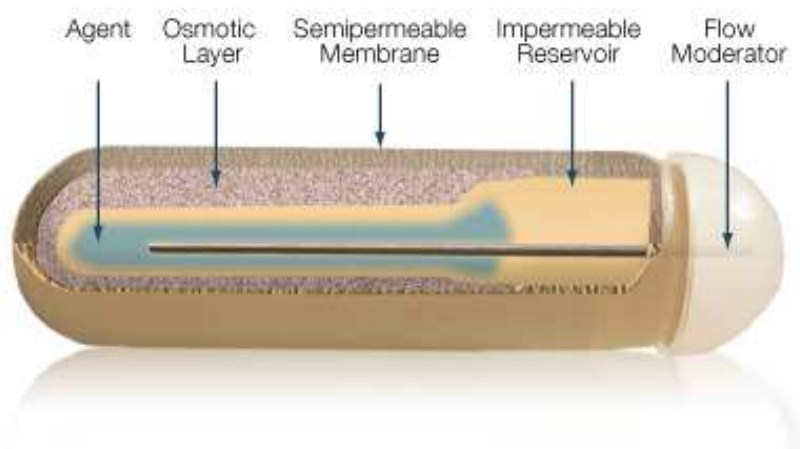


Abbildung 5: Alzet® osmotische Minipumpe.⁹⁸

3.10.2 Befüllung und Starten der Pumpe

Die Befüllung sowie das Starten der Pumpe erfolgte nach Angaben des Herstellers⁹⁸ und soll hier nur in Kürze erklärt werden:

AMD3465 wurde in sterilem PBS in einer Konzentration von 20µg/µl gelöst und jede Pumpe mit 200µl befüllt. Damit wurde eine Dosis von 140µg/d oder 6mg/kg/d erreicht. Die Dosierung von 6mg/kg/d AMD3465 wurde aufgrund der Ergebnisse der Arbeit von Hu et al. gewählt. Hierbei verhinderte die CXCR4-Blockade mit AMD3465 die pulmonale Granulombildung am Mausmodell der T-Lymphozyten-Helfer-2-hypersensitivitäts-Reaktion induziert durch *Schistosoma Mansonii*-Ei-Antigen-Exposition.¹⁰⁰

Für die Kontrollgruppe wurden Pumpen mit 200µl sterilem PBS verwendet.

Die Pumpe wurde vor und nach der Befüllung gewogen. Die Gewichtszunahme nach der Befüllung entspricht dem Volumen der befüllten Lösung. Diese musste über 90% des Reservoirvolumens betragen (>180 µl).

Um die Medikamentenabgabe zu starten wurden die Pumpe vor der Implantation für 40 h in einer 0,9%-igen NaCl-Lösung bei 37°C inkubiert.

3.10.3 Implantation der Pumpe

Die Pumpenimplantation erfolgte einen Tag vor der Gefäßverletzung. Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen am anästhesierten Versuchstier eine subkutane Tasche am Rücken der Tiere geschaffen. Für die Präparation der Tasche wurde zunächst eine ca. 0,5 cm lange Inzision zwischen den Schulterblätter vorgenommen. Anschließend wurde, stumpf eine ca. 3 cm lange und 1 cm breite subkutane Tasche seitlich der Wirbelsäule präpariert und die Pumpe implantiert.

3.11 Durchflusszytometrische Messung der SPCs

Zur Bestimmung der SPC-Mobilisierung nach einer Gefäßverletzung wurde im antikoagulierten peripheren Blut der Mäuse der prozentuelle Anteil an Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen bestimmt.

3.11.1 Durchflusszytometrie

Als Durchflusszytometrie (auch Fluorescence-Activated Cell Sorting FACS®) bezeichnet man die Detektion, Messung und Analyse von Signalen, die von einzelnen Zellen (oder anderen Partikeln) empfangen werden, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten.¹⁰¹

Die Zellen einer Einzelzellsuspension werden zur Analyse durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Diese Technologie erlaubt es, gleichzeitig mehrere physikalische und Fluoreszenz-Parameter einer einzelnen Zelle in einer größeren Zellpopulation quantitativ zu bestimmen. Das Durchflusszytometer misst, wie Zellen das Licht absorbieren, streuen und reflektieren und welche Fluoreszenz diese emittieren. Typischerweise werden die Lichtstreuung aus zwei verschiedenen Winkeln und in der Regel bis zu sechs Fluoreszenzkanälen (je nach Gerät) gemessen.¹⁰¹

Damit kann eine relative Größe (FSC, forward light scatter, Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich 0-10°) und optische Dichte (SSC, side light scatter, Lichtstreuung im 90°-Bereich) berechnet werden. Der FSC ist proportional zur Zellgröße und der SSC zur Zellgranularität. Dies ermöglicht eine grobe Unterteilung der Zellen nach Größen- und Granularitätseigenschaften, z.B. in mononukleäre Zellen, Monozyten und Granulozyten (Abbildung 6 A).¹⁰¹

Der Gebrauch von spezifischen Antikörpern die mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind erlaubt es zudem, die Expression von bestimmten Molekülen auf und in der Zelle nachzuweisen.¹⁰¹

Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/Zelle. Eine gleichzeitige FACS®-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff, charakteristische Emissionsspektren verfügen (Beispiele siehe Tabelle 2).¹⁰¹

Die Messergebnisse können als Einparameter Histogramme oder Zweiparameter-Plot, auch Cytogramm genannt, dargestellt werden. Cytogramme können als sog. Punktwolkendiagramm (dot-plot; DP) Dichtewolkendiagramm (density-plot) oder als Konturwolkendiagramm (contour-plot) dargestellt werden. Hierbei können die Lichtstreuungsparameter oder verschiedene Fluoreszenzeigenschaften gegeneinander aufgetragen werden (Beispiele siehe Abbildung 6).¹⁰¹

In dieser Arbeit wurden ausschließlich DPs verwendet. In einem DP präsentiert jeder Punkt eine Zelle (bzw. gemessene Partikel). Zur Unterscheidung der Zellpopulationen können FSC gegen SSC z.B. in einem DP aufgetragen werden. Anschließend kann das sog. Gating (Umkreisung; Abbildung 6 A) der interessierenden Zellpopulation vorgenommen werden, so dass später nur Zellen aus dem Gate-Bereich gezählt und z.B. auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden können.¹⁰¹

Fluorochrom	Absorptionsmaxima (nm)	Emissionsmaxima (nm)	Abkürzung
APC-Cy7	743	767	PharRed
Fluoreszeinisothiozyanat	495	519	FITC
Phycoerythrin	480/565	578	PE
Red 613	480/565	613	PE-Texas Red

Tabelle 2: Beispiele für Farbstoffe und deren Emissionsspektren.

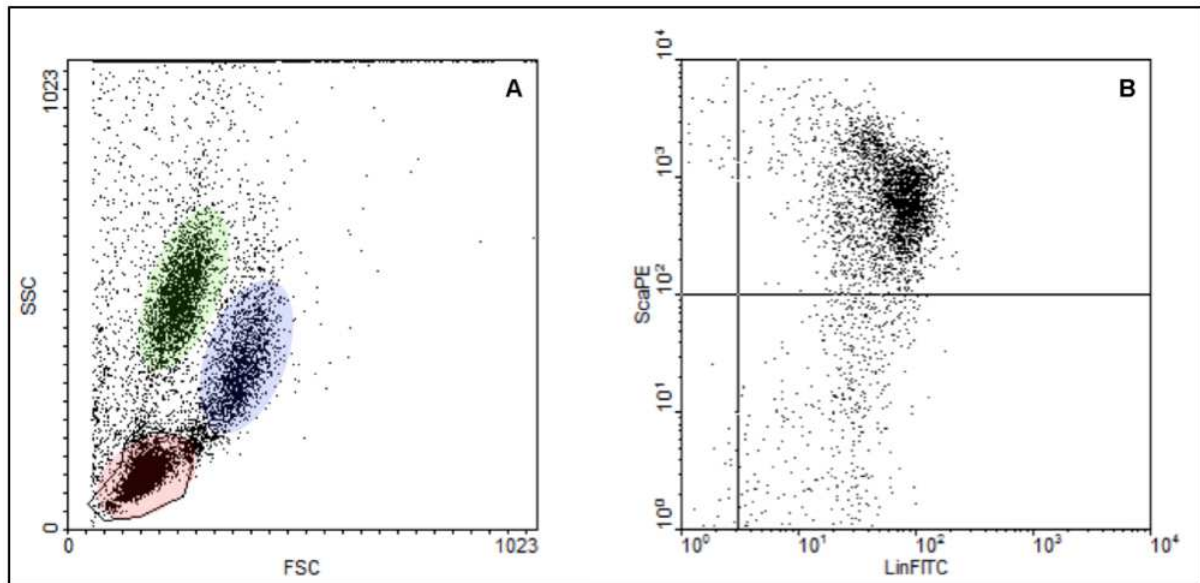


Abbildung 6: Beispiele eines 2-Parameter-DP (periphere Mausblutprobe); A: FSC/SSC-DP; B: FITC/PE-DP; A: rot lymphozytäre Zellen, blau Monozyten, grün Granulozyten.

3.11.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der Schwanzvene zu drei verschiedenen Zeitpunkten:

24 h vor der Gefäßverletzung und Implantation der Pumpe (n=12)

24 h nach der Gefäßverletzung (n=12)

28 d nach der Gefäßverletzung (n=5)

Alle Proben wurden mit Heparin antikoaguliert und am Entnahmetag gemessen.

3.11.3 Vorbereitung der Proben für die Messung

Um den prozentualen Anteil der Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen im peripheren Blut der Maus zu bestimmen wurde das gewonnene Blut mit Sca-1-PE-AK (BD Pharmingen PE anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1), Cat: 553336) und biotinylierten Mouse Lineage Panel-AK

(CD3, CD11b, CD45, Gr-1, TER-119, BD Pharmingen Cat: 559971) nach folgendem Protokoll markiert.³⁶

Für jede Probe wurden 20 µl Blut benötigt, alle Schritte in Rundboden-Röhrchen (BD Falcon):

15 Min.: Lyse der Erythrozyten mit BD FACS-Lysing Solution 10x (BD Pharmingen Cat: 349202), 3 ml/Probe.

5 Min.: Zentrifugation der Proben bei 350 G, ohne Bremse, anschließend eine Dekantierung des Überstandes.

Waschen der Probe mit 1 ml PBS + 0,5% BSA (Bovine Serum Albumine) und Zentrifugation bei 350 G für 5 Min.

Nach der Dekantierung wurde die negative Kontrolle in 1 ml PBS mit 0,5% BSA resuspendiert und bis zur Messung im Kühlschrank oder auf Eis aufbewahrt.

Zugabe von Sca-1-PE- und Lineage-AK, jeweils 1µl/AK, anschließend Inkubation auf Eis für 30 Min.

20 Min.: Konjugation der Lineage-AK mit Streptavidin-FITC (Vector Labs) mit 100 µl FITC-Lösung (FITC-Lösung 1:100 im Bicarbonatpuffer, pH 8,5).

Proben waschen mit 1 ml PBS mit 0,5% BSA, anschließende Zentrifugation für 5 Min.

Überstand wurde dekantiert, Proben in 1 ml PBS mit 0,5% BSA resuspendiert und bis zur Messung kühl aufbewahrt.

3.11.4 Messung und Auswertung der Proben

Nach der Probenvorbereitung (s.o.) erfolgte die durchflusszytometrische Messung mit einem FACScalibur®-Gerät. Die gewonnenen Datensätze wurden mit dem WinMDI-Programm (<http://facs.scripps.edu/software.html>) ausgewertet und in Form eines Dot-plots dargestellt.

Die Messung wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

Messung der positiven und negativen Probe bis 10000 Zellen abgezählt sind, aufgetragen als FSC/SSC-DP.

Definieren eines mononukläeren Zellen-Gates (MZG, Abbildung 7A).

Messung der negativen Probe, bis 10000 Zellen aus dem MZG abgezählt sind.

Darstellung der aus dem Gate gemessenen Zellpopulation in einem FITC/PE-DP und definieren einer Grenze auf der X-Achse (FITC-Kanal) für die nachfolgende Messung der positiven Probe (Bild 7B). Hierbei mussten sich 95% der gemessenen Zellen im unteren linken Quadranten befinden.

Analog zur Messung der negativen Probe erfolgte die Bestimmung der positiven Probe.

Anhand der negativen Probe wurde die FITC-Kanal-Grenze auf die positive Probe übertragen (90°Linie zur Abszisse, Abbildung 7B, 7 D). Die Zellen welche eine Emissionsintensität unterhalb dieser Grenze aufzeigen, werden als Lin⁻ bezeichnet. Um möglichst sicher nur Sca1⁺-Zellen zu erfassen wurde die Grenze für den PE-Kanal einheitlich höher, als in der Kontrolle gemessen, gesetzt. Somit kann der prozentuale Anteil der Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen an mononukleären Zellen im linken oberen Quadranten bestimmt werden (Abbildung 7D).

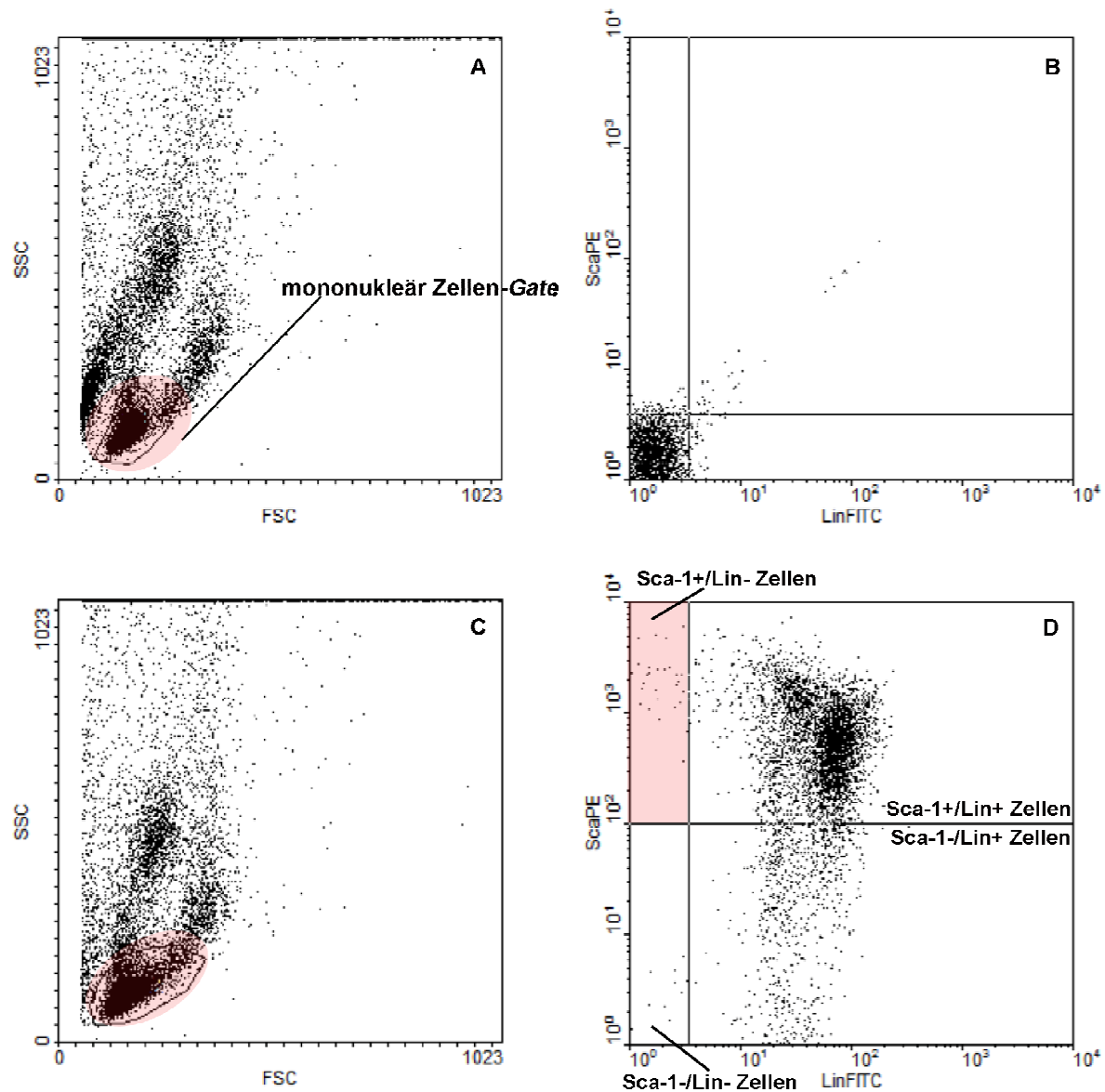


Abbildung 7: Beispielmessung einer positiven und negativen Probe (gleiches Versuchstier); A und C negative bzw. positive Probe mit jeweils einem MZG im FSC/SSC-Dot-plott; B und D negative bzw. positive Probe (FITC/PE-Dot-Plot); D: li. oberer Quadrant(Q): Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen (rot unterlegt) im Beispiel 1,53% der gemessenen Zellen im MZG; re. oberer Q: Sca-1⁺/Lin⁺-Zellen; li. unterer Q: Sca-1⁻/Lin⁻-Zellen; re. unterer Q: Sca-1⁻/Lin⁺-Zellen.

3.12 Vorbereitung der histologischen Präparate und histologische Färbungen

3.12.1 Entnahme der CCA

Vier Wochen nach der CCA-Verletzung wurden die Versuchstiere unter Anästhesie mit Metedomidin und Ketavet, mit zervikaler Dislokation euthanasiert. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und das Herz freigelegt. Über einen Schnitt in den linken Ventrikel wurde ein PE-Schlauch bis in die Aorta vorgeschoben und mit einem Faden fixiert. Nach Eröffnung des rechten Herzohres wurde das Versuchstier, 15 Min. mit 4%-igen Paraformaldehyd perfundiert. Danach wurde die rechte und linke A. carotis communis, einschließlich der Bifurkation mit ECA und ICA, entnommen und in Paraffin eingebettet.³⁶

3.12.2 Paraffineinbettung und Herstellung der seriellen histologischen CCA-Schitte

Die CCA-Präparate wurden in einer senkrechten Position in das Paraffin eingebettet, so dass nach dem Schneiden Querschnitte des Gefäßes erhalten wurden. Nach dem Aushärten der Paraffinblöcke wurden diese in serielle 4 µm Schnitte mit einem Mikrotom (Microm HM 360) geschnitten. Mit der Nummerierung der Schnitte wurde ab der Bifurkation der CCA in proximaler Richtung begonnen, wobei nur ein Gefäßlumen sichtbar sein durfte. Jeweils zwei Schnitte wurden auf einen Objektträger (SuperFrost plus® Gold; Fa. Menzel-Gläser) aufgezogen.

3.12.3 Modifizierte Movat-Pentachrom-Färbung

Die Movat-Pentachrom-Färbung¹⁰² ermöglicht die Darstellung aller Bindegewebetypen in einem histologischen Schnitt. Somit eignet sie sich besonders

gut als eine Übersichtsfärbung und zur computergestützten morphometrischen Bildanalyse.¹⁰³

Die verschiedenen Zellkomponenten bzw. Bindegewebstypen werden wie folgt angefärbt:

Zellkerne: blau-schwarz.

Zytoplasma: gelb-rosa.

Muskelzellen: rot.

Kollagen: gelb.

Knorpel: gelb bis rötlich.

Grundsubstanz (Matrix): blau.

Elastische Fasern: violett-schwarz.

Knochenanlage: dunkelrot.

Auf einem Gefäßschnitt können durch die Movat-Färbung elastische Fasern deutlich sichtbar gemacht werden und somit die Gefäßabschnitte, Intima, Media und Adventitia definiert werden (Abbildung 8). Dadurch wird eine morphometrische Auswertung der Gefäßwandschichten ermöglicht.

3.12.3.1 Färbereagenzien und Protokoll der Movat-Färbung

Die Färbung der histologischen Schnitte erfolgte nach folgendem Protokoll:

Entparaffinieren in Xylol 2 x 5 Min., Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%-, 70%-iger Alkohol).

5 Min.: Wässern im Leitungswasser.

30 Sec. – Beizen in 3% Essigsäure.

30 Min. – Färben im Alcianblau (Tabelle 3) – Färben der Grundsubstanz.

1 Min. – Wässern.

6 Min. – Fixieren in der Verhoef-Gebrauchslösung (Tabelle 3).

10 min. – Wässern.

3 Min. – Brilliant-Crocein-Gebrauchslösung (Tabelle 3) – Färben der Muskeln und Zellen.

Spülen in 1% Essigsäure zur Fixierung.

15 min – 2% Phosphorwolframsäure – Beizen und Differenzieren.

1 min - 1% Essigsäure – Differenzieren.

3 x 1min – 100% Ethanol.

3 Min – 6% Safron du Gatinais.

Dehydrieren: 2 x 3min 100% Ethanol, kurz in Xylol.

Eindeckeln mit Deckgläschen und Entellan®-Einschlussharz.

Alcian blau 1%	1g Alcian blau 8 GX Sigma A5628 99 ml Aqua destilata 1ml Essigsäure 100%
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	Stammlösung A Brilliant-Crocein: 0,1g Brilliant-Crocein Scarlet Fluka, 27970,C.I. 27290, 0,5 ml 100% Essigsäure 99,5 ml Aqua destilata
	Stammlösung B Säurefuchsin: 0,1g Säurefuchsin Merck, 105231 0,5 ml 100% Essigsäure 99,5 ml Aqua destilata
Voerhoff-Vorattslösungen	Stammlösung A: 2g Hämatoxylin Sigma, H3136 100ml Ethanol
	Stammlösung B: 2g Eisen(III)-Chlorid Merck, 8.03945.0500 100ml Aqua destilata
	Stammlösung C Lugol-Lösung: 4g Kaliumiodid, 2g Iod 100 ml Aqua destilata
	Verhoeff-Gebrauchslösung-: Stammlösungen A : B : C = 3 : 2 : 1 (immer frisch zubereiten)
Saffron du Gatinais 6%	6g Saffron du Gatinais, Sigma S8381, C.I. 75100 100 ml 100% Ethanol 48h bei 50°- 60°C extrahieren, Luftdicht verschließen.
Phosphorwolframsäure 2%	2,4g Phosphorwolframsäure 100 ml Aqua destilata

Tabelle 3: Übersicht über die Färbereagenzien und deren Zusammensetzung

3.12.4 Immunohistochemie und Immunfluoreszenz

Die Immunohistochemie bzw. Immunofluoreszenz ist eine Methode mit der bestimmte Oberflächenmoleküle oder Zellkomponenten mit Hilfe spezifischer Antikörper im Gewebe markiert werden können. Diese können dann mit Hilfe entsprechender Färbungen sichtbar gemacht und bestimmten Strukturen im Gewebe zugeordnet werden.

In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode der Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz verwendet. Jeweils drei Schnitte pro Versuchstier wurden aus dem Bereich proximal der Bifurkation (0-100 μm) ausgesucht und angefärbt.

3.12.4.1 Immunohistochemie für α -SMA

Zur Darstellung der glatten Muskelzellen in der Neointima wurde eine immunhistochemische Färbung für α -SMA-Epitope durchgeführt.

Der Primärantikörper (α -SMA clone 1A4, Fa. Dako®¹⁰⁴) wurde mit dem Sekundärantikörper (Impress Universal Reagent Peroxidase MP 7500, Vector® Labs) gekoppelt und immunhistochemisch durch Peroxidase-DAB-Färbereaktion sichtbar gemacht (DAB Substrate Kit Peroxidase SK 4100, Vector® Labs). Da sich immer zwei Schnitte auf einem Objektträger befinden, wurde eine negative Kontrolle am gleichen Objektträger angefertigt. Für die Kontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen.

Protokoll der Färbung:

Entparaffinieren (s. 3.12.3.1).

5 Min.: Wasser.

5 Min.: 3% Wasserstoffperoxid.

5 Min.: PBS-Puffer.

20 Min.: Pferdeserum (Kit).

Kurz Abklopfen.

1 h: Primäreantikörper 1:100 in PBS-Puffer.

5 Min.: PBS-Puffer.

30 Min.: Impress Reagent Peroxidase, Sekundärantikörper (Kit).

5 Min.: PBS-Puffer.

5 Min.: DAB Substrate Kit.

5 Min.: Wasser.

3 Sec.: Hämalan.

5 Min.: Wässern.

Kurzes Ziehen der Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe (70%-, 96%- und 100%-iger Alkohol).

Eindeckeln mit 18x18 mm Deckgläschen und Vecta Mount®-Einschlusslösung

3.12.4.2 Immunfluoreszenzfärbung für Mac-2

Zur Quantifizierung des Makrophagen-Anteiles der Neointima wurde das spezifischen Maus-Makrophagen-Antigen 2¹⁰⁵ (Mac-2, clone M3/38, Cedarlane®) benutzt. Der gebundene sekundäre AK (biotinylated anti-rat IgG (H+L), Vector® Labs, cat. BA-4001) wurde mit dem Streptavidin-FITC (Vector® Labs) konjugiert. Als negative Kontrolle diente Kaninchen-IgG-AK (Santa Cruz® sc-2027 Lot K 1005). Diese wurde am gleichen Objektträger analog zum Kapitel 3.12.4.1. angefertigt

Protokoll der Färbung:

Entparaffinieren (s. 3.12.3.1).

10 Min.: 10% Kaninchenserum (KS) (C12SA Serotec®).

1h: Primärantikörper in 0,5% KS 1:400. Negative Kontrolle: Kaninchen-IgG-AK in 0,5% KS 1:400.

5 Min.: PBS-Puffer.

1 h: Sekundärantikörper biotinylierter anti-Ratten IgG (H+L) in 0,5% KS 1:100.

5 Min.: PBS-Puffer.

30 Min.: Streptavidin-FITC in Natriumbicarbonat-Puffer pH 8,5 1:100.

Kurz Abklopfen

5 Min.: PBS-Puffer.

Eindeckeln mit Deckgläschen und Vectashield®-Einschlusslösung.

3.12.4.3 Immunfluoreszenzfärbung für VE-Cadherin

Zur Untersuchung der Reendothelialisierung nach einer Gefäßverletzung wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung für VE-Cadherin durchgeführt. VE-Cadherin (vascular endothelial cadherin) ist ein endothel-spezifisches Adhäsionsmolekül.¹⁰⁶

Als Primärantikörper wurde anti-VE-Cadherin-AK (Santa Cruz® sc6458) verwendet. Eine Antigendemaskierung¹⁰⁷ wurde durch Kochen (siehe Protokoll) der Schnitte in Citrat-Puffer mit 0,05% Tween® erreicht. Der sekundäre AK war Kaninchen-anti-Ziege-IgG-B (Santa Cruz® sc2774). Eine Signalverstärkung wurde mit dem Tyramidsystem (Tyramide Signal Amplification TSA™-Biotin-System, Perkin Elmer®, NL700A) vorgenommen. Der biotinylierte Sekundärantikörper wird mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Streptavidin-HRP) konjugiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Signalverstärkung durch Interaktion der Peroxidase mit TSA-Molekülen, wobei freie TSA-Radikale entstehen. Die Radikale binden kovalent an freie Tyrosinreste der gebundenen AK proximal der Peroxidase. Die so gebundenen biotinylierten TSA-Radikale können im nächsten Schritt mit Streptavidin-FITC konjugiert und somit sichtbar gemacht werden. Da jetzt viele Biotin-Streptavidin-FITC-Konjugate über dem gewünschten Epitop vorhanden sind, wird das Signal um das vielfache verstärkt. Zur weiteren Information: www.perkinelmer.de/tsa

Alle Puffer wurden entsprechend den Herstellerangaben hergestellt.

Die negative Kontrolle wurde ohne primären AK durchgeführt.

Protokoll der Färbung:

Entparaffinieren (s. 3.12.3.1).

5 Min. TNT-Puffer (0,1 M TRIS-HCl; pH 7,5; 0,15 M NaCl, 0,05% Tween®).

5 Min. TNT-Puffer.

3 x 5 Min.: Antigendemaskierung im Citrat-Puffer + 0,05% Tween, Objektträger in der Mikrowelle kochen.

20 Min.: abkühlen lassen.

30 Min.: TNB-blocking-buffer(kit), danach abklopfen nicht waschen.

Primärantikörper VE-Cadherin in TNB 1:100 – über Nacht bei 4°C in Feuchtkammer.

3 x 5 Min.: TNT-Puffer - waschen 60 Min. biotinylierter Sekundäreantikörper in TNB 1:200.

3 x 5 Min.: TNT-Puffer - waschen 30 Min.: Streptavidin-HRP (kit) in TNB 1:100.

3 x 5 Min.: TNT-Puffer - waschen.

10 Min.: Biotinylierter Tyramide Amplification Reagent (kit) in 1x Amplification Diluent (kit) 1:50.

3 x 5 Min.: TNT-Puffer - waschen.

30 Min.: Streptavidin-FITC in TNB 1:33 3 x 5 Min.: TNT-Puffer - waschen.

Eindeckeln mit Deckgläschen und Vectashield®-Einschlusslösung.

3.12.4.4 Immunfluoreszenzfärbung für Ki67

Zur Untersuchung der Zellproliferation sieben und 28 Tage nach der Gefäßverletzung wurde eine Immunfluoreszenzfärbung für den Proliferationsmarker Protein-Ki67^{108,109} durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Kaninchen-anti-Ki67-AK (SP6 clone, Novus®, Cat. NB110-57147) ausgewählt, da es auch mit Mausprotein-Ki67 kreuzreagiert. Als Sekundärantikörper wurde biotinyliertes Anti-kaninchen-IgG (Serotec® 2AB02B) verwendet und anschließend durch Inkubation mit FITC-Streptavidin (Vector® Laboratories SA-5001) nachgewiesen. Eine negative Kontrolle

wurde mit dem nicht-biotinylierten Anti-Kaninchen-AK(Novus®, Cat. NB810-56910) als primärer AK durchgeführt.

Protokoll der Färbung:

Entparaffinieren (s. 3.12.3.1).

5 Min PBS.

3 x 5 Min. Kochen in der Mikrowelle im Citratpuffer + 0,05% Tween® zur Antigendemaskierung.

20 Min. Präparate abkühlen, anschließend kurz in Aqua destilata waschen.

5 Min. in PBS.

10 Min. in 10 %-iges Schafsserum (Serotec® C14Sa) in PBS, anschließend abklopfen.

Primärantikörper 1:100 in 0,5 %igen PBS/Schafsserum, über Nacht bei 4 °C in Feuchtkammer.

5 Min. waschen in PBS.

1 h Sekundärantikörper, RT 1:200 in 0,5% PBS/Schafsserum.

30 Min. Streptavidin-FITC in 1:100 Natrium-Bikarbonat-Puffer PH 8,5.

5 Min. Waschen in PBS.

Eindeckeln mit Deckgläschen und Vectashield®-Einschlusslösung.

3.13 Mikroskopie und morphometrische Analyse

Die histologischen Präparate wurden mit Hilfe eines kombinierten Fluoreszenz- und Lichtmikroskops (Leica DMRBE) über eine angeschlossene CCD Kamera (JVC) für die morphometrische Messungen und Präsentationen aufgenommen.

Die morphometrische Messung wurde computergestützt mit einem Bildauswertungsprogramm (Diskus Software, Fa. Hilgers, Bonn) durchgeführt. Es

wurden die luminale Fläche (LF), die durch die Elastica interna (EIF)- und durch die Elastica externa begrenzte Fläche (EEF) planimetriert (Abbildung 6). Die neointimale und mediale Fläche wurde dann wie folgt berechnet:

Neointimafläche = EIF - LF

Mediafläche = EEF - EIF

Die Fläche der α -SMA und Mac-2 positiven neointimalen Bereiche wurde mittels Planimetrie bestimmt und zur neointimalen Fläche in jedem Schnitt in Verhältnis gesetzt. Die Fläche wurde in mm^2 berechnet.

Die Lipidkernfläche wurde an jeweils zehn Schnitten/ Maus/ Gruppe (modifizierte Movat-Färbung¹⁰²) in 0-400 μm und die Dicke der fibrösen Kappe wurde an jeweils drei Schnitten/ Maus/ Gruppe (α -SMA-IH) in 0-100 μm Bereich ab der ACC-Bifurkation morphometrisch gemessen.

Für die Endothelialisierung wurde das VE-Cadherin als Marker verwendet. Die VE-Cadherin-positiven luminalen Bereiche wurden als prozentualer Anteil des gesamten Lumenumfangs ausgedrückt.

Zur Untersuchung der Proliferation wurde mittels eines Handzählers die Gesamtzahl der vorhandenen Zellkerne sowie die Zahl der Ki67-positiven Zellen der Gefäßwand gezählt. Schließlich wurde der prozentuale Anteil der Ki67-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet.

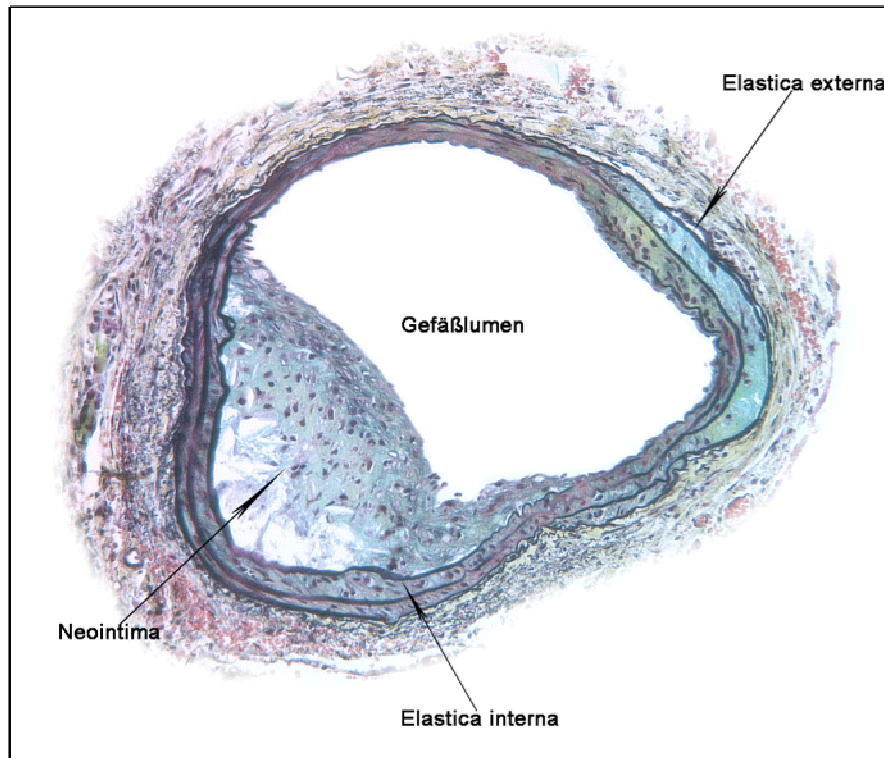


Abbildung 8: Beispiel eines CCA-Gefäßquerschnittes vier Wochen nach der Gefäßverletzung (modifizierte Movat-Färbung), ca. 80 μ m proximal der CCA-Bifurkation

3.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 4.0®. Die Gruppen wurden mittels unpaired 2-tailed Student's t test verglichen. Der statistische Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte mit dem 1-way ANOVA-Test gefolgt von dem Newman-Keuls-Posttest, falls erforderlich. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde ab einem p-Wert kleiner 0,05 definiert.³⁶

4 Ergebnisse

4.1 Neointima- und Mediafläche nach AMD3465-Behandlung

Aufgrund der Rolle von SDF-1 α /CXCR4-Achse auf die Entstehung einer Neointima nach induzierter akzelerierter Atherosklerose^{36,40}, könnten CXCR4-Antagonisten eine therapeutische Option zur Behandlung einer Restenose nach PTCA oder Stent-Implantation sein. Um die Wirksamkeit einer pharmakologischen Hemmung von CXCR4 zu untersuchen wurde der Effekt von AMD3465^{87,88} auf die neointimale Formation nach Verletzung der ACC in hyperlipidämischen ApoE^{-/-}-Mäusen untersucht (Kapitel 3.8).

Die Untersuchung der verletzten ACC fand vier Wochen nach der Gefäßverletzung und entsprechender Behandlung der Mäuse mit AMD3465 oder PBS (Kontrolle) statt. Nach Vorbereitung der Präparate wurden serielle 4 μ m Querschnitte der ACC im Bereich von 0-400 μ m proximal der Bifurkation angefertigt. Es wurden jeweils 10 Schnitte/ Maus/ Gruppe im gleichen Abstand ab der Bifurkation ausgesucht und einer modifizierten Movat-Färbung¹⁰² unterzogen. Anschließend erfolgte eine morphometrische Auswertung mittels eines Analyseprogrammes (Kapitel 3.13).

Die morphometrische Analyse ergab eine mittlere neointimale Fläche von $0,05 \pm 0,006 \text{ mm}^2$ (N=4) in Mäusen die über eine osmotische Pumpe PBS subkutan infundiert bekamen. Im Vergleich dazu führte die vierwöchige Applikation von AMD3465 im Mittel zu einer neointimalen Fläche von $0,02 \pm 0,006 \text{ mm}^2$ (N=4). Dies entspricht einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung um 59% ($P < 0,05$, Abbildung 9 A-E).

Verglichen mit PBS-behandelten Mäusen war die Mediafläche tendenziell verringert bei den Mäusen die mit AMD3465 behandelt wurden ($0,04 \pm 0,005 \text{ mm}^2$, N=4) ($0,06 \pm 0,01 \text{ mm}^2$, N=4) (Abbildung 9A-D, F). Diese Differenz war jedoch nicht statistisch signifikant.

Entsprechend war das Verhältnis zwischen der mittleren Neointimafläche zur Mediafläche (Intima/ Media-Ratio, IMR) durch die AMD3465 Behandlung signifikant reduziert worden ($0,42 \pm 0,1$ in AMD3465-behandelten Mäusen im Vergleich zu $0,85 \pm 0,13$ in PBS-behandelten Mäusen, $P < 0,05$ (Abbildung 9 A-D, G).

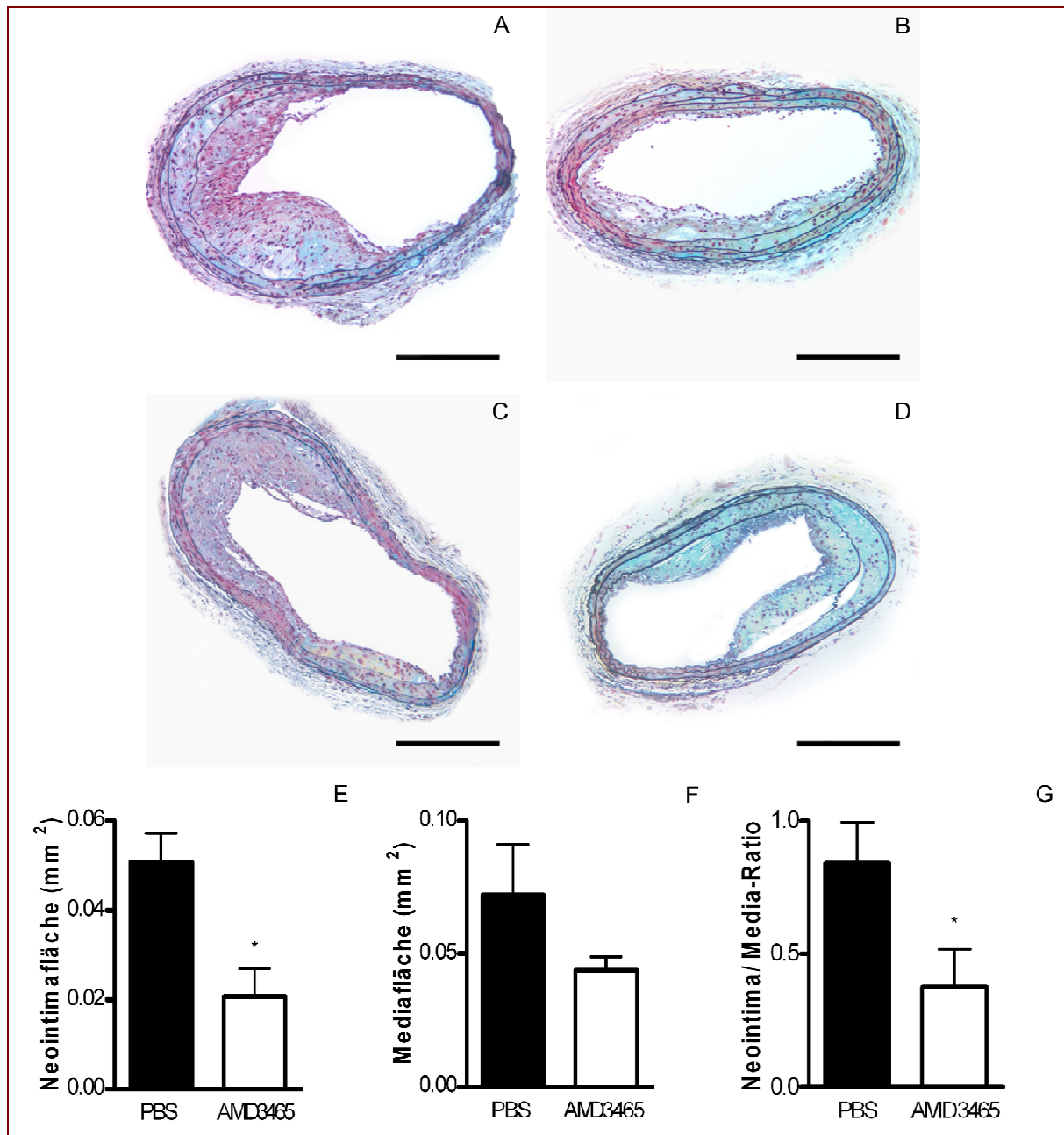


Abbildung 9: Repräsentative Schnitte der A. carotis communis (modifizierte Movat-Färbung¹⁰²) vier Wochen nach der Gefäßverletzung. Es wurde die 4-wöchige Behandlung mit PBS (A u. C) mit der Behandlung mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3465 (B u. D) verglichen. Die morphometrische Auswertung ergab eine signifikante Reduktion der Neointimafläche in AMD3465-behandelten Mäusen (E). Die Mediafläche war tendenziell ebenfalls durch AMD3465 verringert, allerdings ohne statistisch signifikant zu sein (F). Bei

den AMD3465-behandelten Mäusen nach der Gefäßverletzung war der Verhältnis von neointimaler zu medialer Fläche ebenfalls reduziert in (G) * $P < 0,05$; Balkenskala = 200 μm .

4.2 Charakterisierung der zellulären Plaquezusammensetzung

4.2.1 Anteil der glatten Muskelzellen und Makrophagen an der Neointima

Im Folgenden sollte ermittelt werden ob die AMD3465-Behandlung die zelluläre Zusammensetzung der Neointima verändert und dadurch die verminderte neointimale Hyperplasie erklärt werden kann. Da insbesondere der Anteil an Glatten Muskelzellen und Makrophagen in dem Drahtverletzungsmodell in ApoE^{-/-} Mäusen vorherrscht wurden diese Zellpopulationen primär untersucht. Zur Klärung dieser Frage wurde 28 Tage nach der Gefäßverletzung eine immunohistochemische bzw. Immunofluoreszenz-Färbung für α -SMA- (α -SMA-IH) bzw. Mac-2-Epitope (Mac-2-IF) (Kapitel 3.12.4.1/2) an jeweils drei histologischen Schnitten pro Maus und Gruppe proximal der ACC-Bifurkation (0-100 μm) vorgenommen. Anschließend erfolgte eine morphometrische Analyse der α -SMA- bzw. Mac-2-positiver neointimaler Fläche (α -SMA⁺, Mac-2⁺) bezogen auf die gesamte neointimale Fläche.

Verglichen mit der Kontrollgruppe führte die Behandlung mit AMD3465 zur einer 57%-igen Verringerung des α -SMA⁺/NI in der AMD3465-Gruppe (\emptyset PBS $0,37 \pm 0,06$; \emptyset AMD3465 = $0,16 \pm 0,03$; n=4/Gruppe; $P < 0,05$; Abbildung 10 A,B,E).

Auf den Makrophagen-Neointimagehalt hatte die Behandlung mit AMD3465 keinen Einfluss. Die morphometrische Analyse von Mac-2⁺/NI zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der AMD3465- und PBS-Gruppe (\emptyset PBS $0,32 \pm 0,07$; \emptyset AMD3465 = $0,28 \pm 0,01$; n=4/Gruppe; $P = \text{NS}$; Abbildung 10 C, D, F).

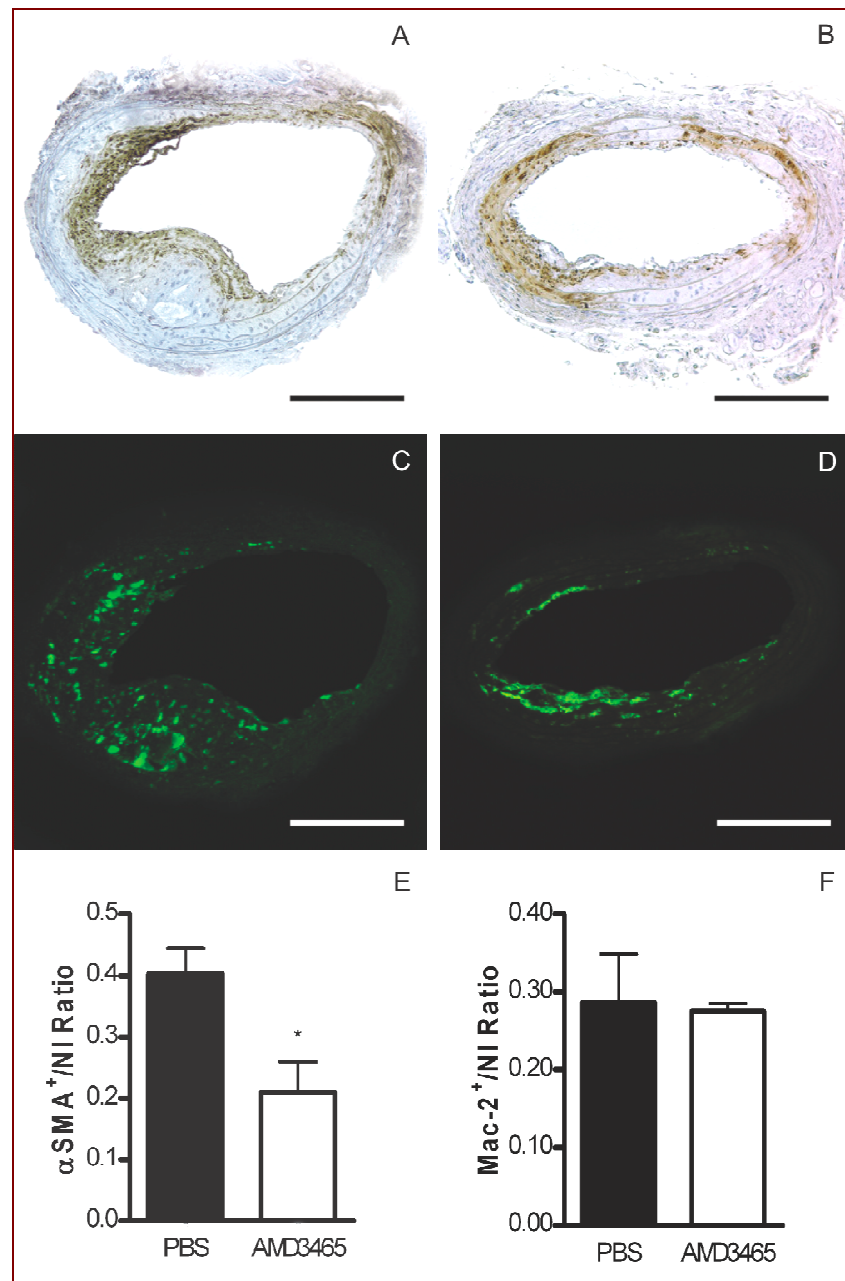


Abbildung 10: Einfluss von AMD3465 auf die zelluläre Zusammensetzung der Neointima. Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung für α -SMA (A und B) und Immunfluoreszenz-Färbung für Mac-2 (C und D) von histologischen Schnitten der A. carotis von PBS- (A und C) und AMD3465- (B und D) behandelten Mäusen. Die planimetrische Auswertung der zell-spezifischen Färbungen zeigte, dass AMD3465 den neointimalen Anteil an α -SMA⁺ Zellen (E) verringerte, während der Gehalt an Mac2⁺ Zellen (F) unverändert blieb. * P<0,05; Balkenskala = 200 μ m

4.2.2 Einfluss von AMD3465 auf histologische Parameter der Plaquestabilität

Fortgeschrittene atherosklerotische Plaques sind charakterisiert durch einen prothrombotischen Lipidkern mit Cholesterinkristallen und Zelldedritus der durch eine fibröse Kappe bestehend aus glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix vom Gefäßlumen abgegrenzt wird.⁹ Das Vorhandensein eines großen Lipidkerns und einer dünnen fibrösen Kappe charakterisieren einen vulnerablen Plaque.¹¹⁰ Bei den Mäusen, die mit AMD3465 behandelt wurden, konnte in den neointimalen Läsionen ein signifikant kleinerer Lipidkern ($0,002 \pm 0,0005 \text{ mm}^2$, $N=4$) im Vergleich zur PBS-Behandlung ($0,010 \pm 0,002 \text{ mm}^2$, $N=4$, $P < 0,05$, Abbildung 11A) nachgewiesen werden. Die Dicke der fibrösen Kappe war bei den mit AMD3465-behandelten Mäusen ($23,8 \pm 6,1 \text{ }\mu\text{m}$) ebenfalls deutlich geringer als bei den PBS-behandelten Mäusen ($43,6 \pm 2,3 \text{ }\mu\text{m}$, $N=4$, $P < 0,05$, Abbildung 11B).

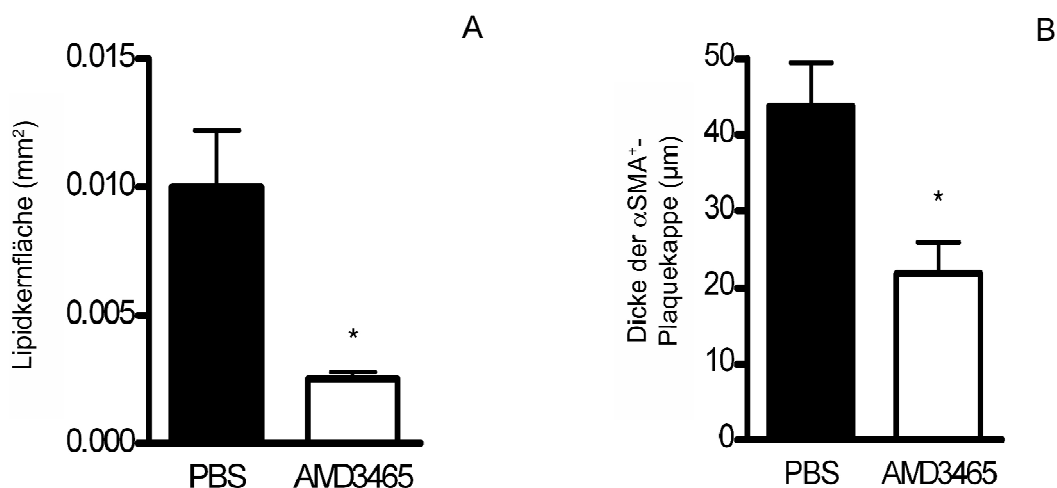


Abbildung 11: Effekt von AMD3465 auf histologische Parameter der Plaquestabilität. Der neointimale Lipidkern war bei den AMD3465-behandelten Mäusen deutlich geringer als in der Kontrollgruppe (A). AMD3465 reduzierte im Vergleich zur PBS-Behandlung signifikant die Dicke der fibrösen Kappe (B). * $P < 0,05$.

4.3 Reendothelialisierung nach AMD3465 Behandlung

Hinsichtlich des möglichen therapeutischen Einsatzes von CXCR4-Antagonisten in der Restenoseprävention ist die Auswirkung auf die Reendothelialisierung von besonderem Interesse, da verminderte Reendothelialisierung ein entscheidender Risikofaktor für die späten Stentthrombosen bei konventionellen Medikamenten-beschichteten Stents darzustellen scheint.^{111,112}

Um die Reendothelialisierung zu untersuchen, wurden sieben und 28 Tage nach Gefäßverletzung jeweils drei Schnitte/ Maus/ Gruppe (N=4) aus dem Bereich proximal der Bifurkation (0-100µm), einer Immunfluoreszenzfärbung für VE-Cadherin (siehe Kapitel 3.12.4.3) unterzogen und anschließend morphometrisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der VE-Cadherin-positiven Zellen des luminalen Umfangs angegeben.

Nach sieben Tagen war die Gefäßinnenwand in den PBS-behandelten Mäusen zu $69,7 \pm 5,1\%$ (N=4) reendothelialisiert. Im Vergleich dazu zeigte sich in den AMD3465-behandelten Mäusen ($66,8 \pm 3,2\%$, N=4) kein signifikanter Unterschied (Abb. 12 A, B, E). Nach 28 Tagen hatte der Anteil der reendothelialisierten Gefäßinnenwand in der PBS-Gruppe auf $92,5 \pm 2,4\%$ (N=4) zugenommen. Die AMD3465-Behandlung hatte gegenüber der PBS-Behandlung auch nach 28 Tagen zu keinem signifikanten Unterschied in der Reendothelialisierungsrate geführt ($91,5 \pm 1,4\%$, N=4, P=NS, Abb 12C, D, G); Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Hemmung von CXCR4 durch AMD3465 nicht zu einer verzögerten Reendothelialisierung führt.

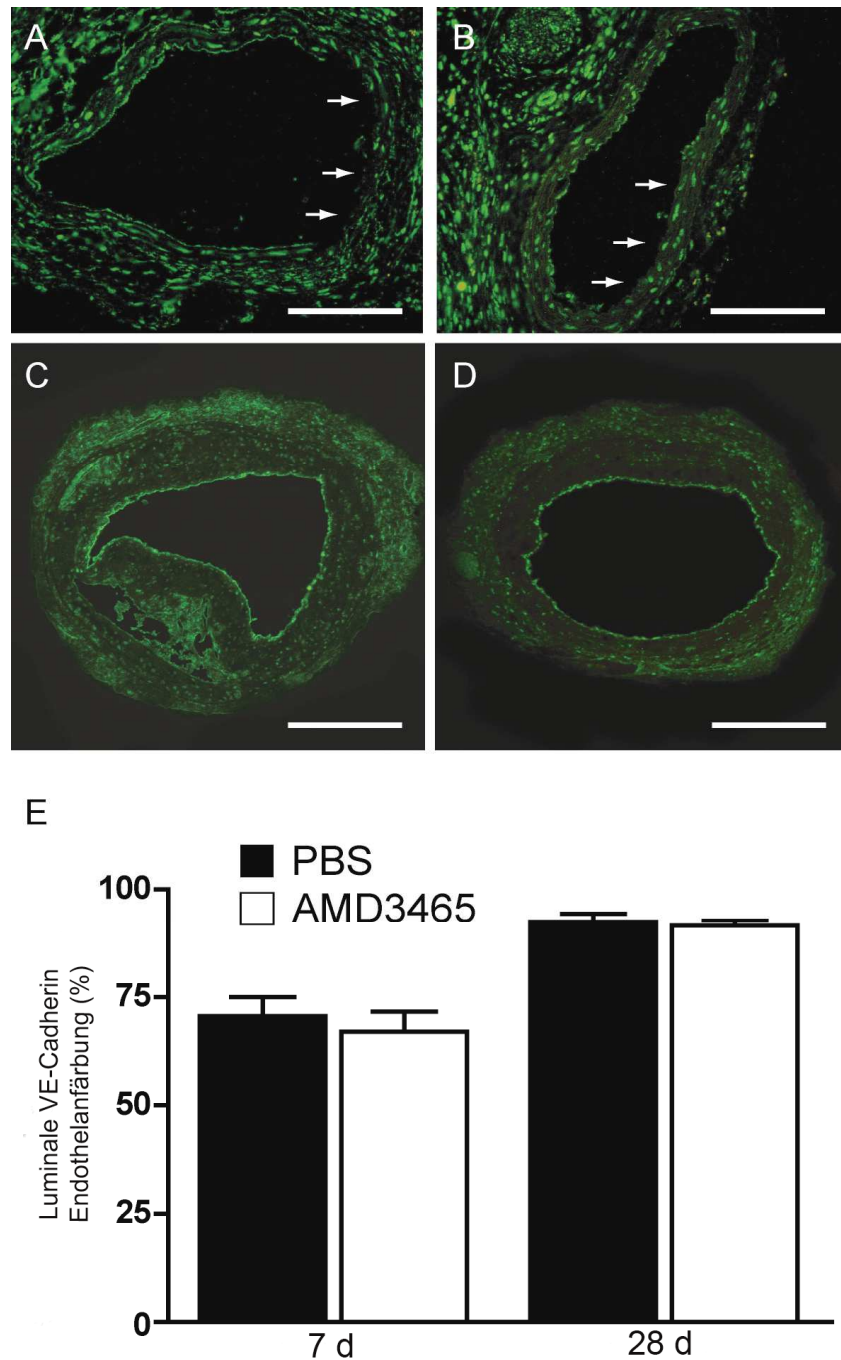


Abbildung 12: AMD3465-Behandlung und Reendothelialisierung nach einer Gefäßverletzung. Der Anteil der Gefäßinnenwand mit VE-Cadherin⁺ Endothelzellen sieben Tage nach Gefäßverletzung (A, B) war zwischen PBS- (A, E) und AMD3465-behandelten Mäusen nicht verschieden (B, E). Nach 28 Tagen zeigte sich in beiden Gruppen eine Zunahme der Reendothelialisierung (C, D), ohne dass sich ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den PBS- (C) und AMD3465-behandelten (D) Mäusen ergeben hätte (E). Balkenskala = 200µm.

4.4 AMD3465 und Proliferation neointimaler Zellen

Nach einer Gefäßverletzung kommt es im Verlauf zu einer Akkumulation der neointimalen SMC in der verletzten Gefäßwand die durch einen synthetischen Phänotyp mit einer gesteigerten Proliferationsrate charakterisiert sind¹⁶. Ein Großteil dieser neointimalen SMC stammt von zirkulierenden SPC ab.^{36,40} Die Proliferation der durch die SDF-1 α / CXCR4-Achse rekrutierten SPC könnte wesentlich bei der Entstehung einer neointimalen Hyperplasie beitragen.⁶ Es sollte deshalb der Einfluss von AMD3465 auf die Zellproliferation in der verletzten Gefäßwand untersucht werden.

Hierfür wurde sieben und 28 Tagen nach der Drahtverletzung der A. carotis communis drei Schnitte/ Maus/ Gruppe (N=4) mit der Immunofluoreszenzmethode für den Zellproliferationsmarker Ki67 (Kapitel 3.12.4.4) angefärbt. Der Ki67-Antikörper markiert ein nukleäres Antigen, welches in allen Phasen der Mitose (S-, G1-, G2- und M-Phase) von normalen und neoplastischen, menschlichen Zellen exprimiert wird. In der G0-Phase, d.h. bei ruhenden Zellen ist das Ki-67-Antigen nicht zu finden.¹⁰⁹ Seine endgültige Funktion ist nicht eindeutig geklärt, es ist jedoch bekannt, dass es eine bedeutende Rolle bei der Zellteilung spielt. Es ist ein bimolekularer Komplex von 345kD und 395kD Molekulargewicht und wird durch ein Gen des Chromosoms 10 kodiert.¹⁰⁹

Es wurden alle Ki67-positive (Ki67⁺) Gefäßwandzellen gezählt und in Verhältnis zur Gesamtzellzahl gestellt. Die Ergebnisse sind in Prozent angegeben.

Im Vergleich zur PBS-Behandlung zeigte sich sieben Tage nach der Gefäßverletzung eine signifikante Reduktion der Ki67⁺-Zellen in der AMD3465-behandelten Gruppe (1,4 \pm 0,4% vs. 3,4 \pm 0,7%, N=4/Gruppe, P<0,05; Abb. 13A, B, C). Nach 28 Tagen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden (1,0 \pm 0,3% vs 1,7 \pm 0,4%, N=4/Gruppe, P=NS, Abbildung 13 C).

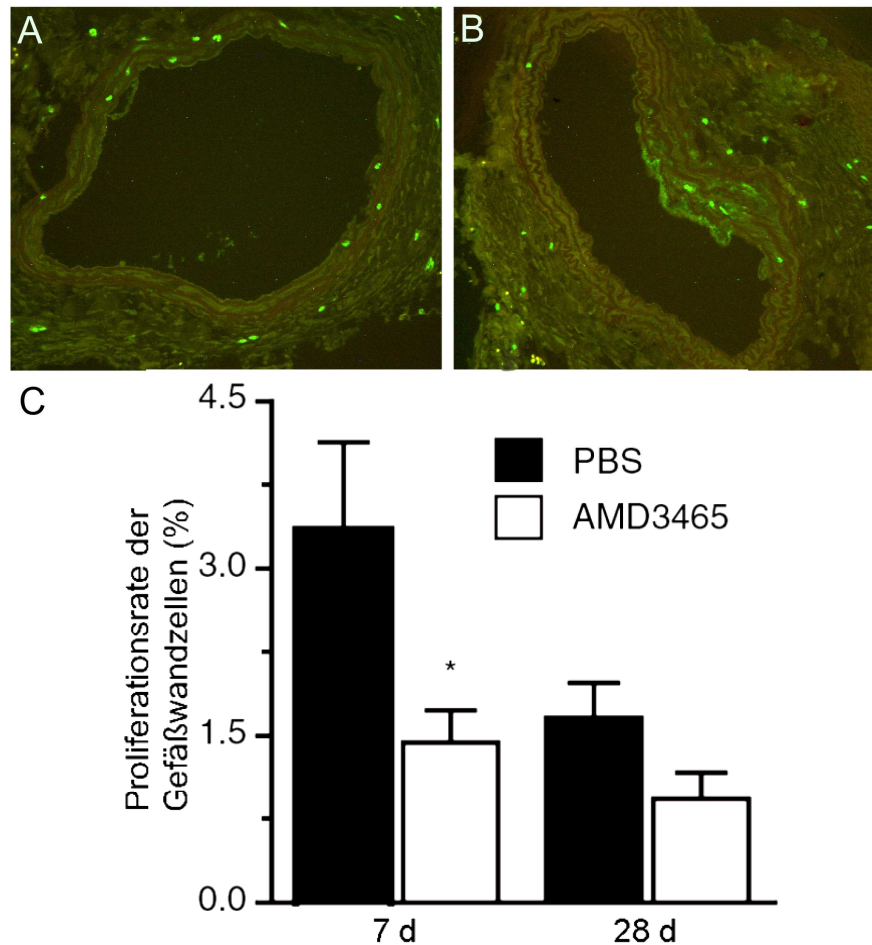


Abbildung 13: Auswirkung der AMD3465-Behandlung auf die Proliferationsrate in der verletzten Gefäßwand. Gezeigt sind die repräsentativen Immunfluoreszenzfärbungen für den Proliferationsmarker Ki67 in PBS-(A) und AMD3465-behandelten (B) Mäusen sieben Tage nach Drahtverletzung der A. carotis communis. (C) Sieben Tage nach der Gefäßverletzung war die Proliferationsrate in der AMD3465-Gruppe deutlich verringert gegenüber der Kontrollgruppe (PBS). Nach 28 Tagen war kein statistisch relevanter Unterschied in der Proliferationsrate zwischen AMD3465- und PBS-behandelten Mäusen mehr nachweisbar. * $P < 0,05$.

4.5 Auswirkung der AMD3465-Behandlung auf Mobilisation der SPC nach der Gefäßverletzung

Nach einer Gefäßverletzung kommt es zu einer SDF-1 α -vermittelten Expansion der Sca-1⁺/Lin⁻ SPC im peripheren Blut.³⁶ Diese aus dem Knochenmark stammenden Zellen werden in die verletzte Gefäßwand rekrutiert, differenzieren sich weiter in

neointimale SMC und bilden einen Großteil der Neointima.^{36,40} Eine Inhibition der SDF-1 α -induzierten SPC-Mobilisation durch einen anti-SDF-1 α -mAK führte zu einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung nach einer Gefäßverletzung.³⁶

Aufgrund dieser Befunde wurde der Effekt der Inhibition von CXCR4 durch AMD3465 auf die Mobilisation der SPC nach einer Gefäßverletzung untersucht. Hierfür wurde eine durchflusszytometrische Quantifizierung der Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen, die SPC enthalten, vorgenommen. Die Messungen wurden 24 h vor und 24 h bzw. vier Wochen nach der Gefäßverletzung aus dem heparinisierten peripheren Blut der Mäuse durchgeführt und in Prozent der mononukleären Zellen ausgedrückt (siehe Kapitel 3.11).

Die Quantifizierung der Sca-1⁺/Lin⁻ Zellen vor der Gefäßverletzung ergab einen vergleichbaren Anteil von $0,7 \pm 0,2\%$ in der PBS-Gruppe und $0,6 \pm 0,1\%$ in der AMD3465-Gruppe (N=5; P=NS, Abbildung 14D).

Die Gefäßverletzung führte nach 24 h zu einem Anstieg der Sca-1⁺/Lin⁻ Zellfraktion in der PBS-Kontrollgruppe (N=5) auf $1,8 \pm 0,7\%$ (Abb. 14B, D). Im Gegensatz dazu war in AMD3465-behandelten Mäusen der Anteil an Sca-1⁺/Lin⁻ Zellen deutlich geringer ($0,5 \pm 0,2\%$, N=5; $P < 0,001$ verglichen mit PBS; Abbildung 14C, D). Dies war möglicherweise bedingt durch eine Hemmung der SDF-1 α -vermittelten Mobilisierung nach Gefäßverletzung. Nach vier Wochen ging der Anteil zirkulierender Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen in den PBS-behandelten Mäusen auf $0,4 \pm 0,1\%$ zurück und war damit nicht mehr verschieden von den Ausgangswerten vor der Gefäßverletzung. In den AMD3465-behandelten Mäusen betrug die Sca-1⁺/Lin⁻ Zellfraktion vier Wochen nach der Gefäßverletzung $0,6 \pm 0,6\%$ und war damit tendenziell höher als in der PBS-Gruppe, ohne allerdings ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen (N=5/Gruppe; P=NS; Abbildung 14D).

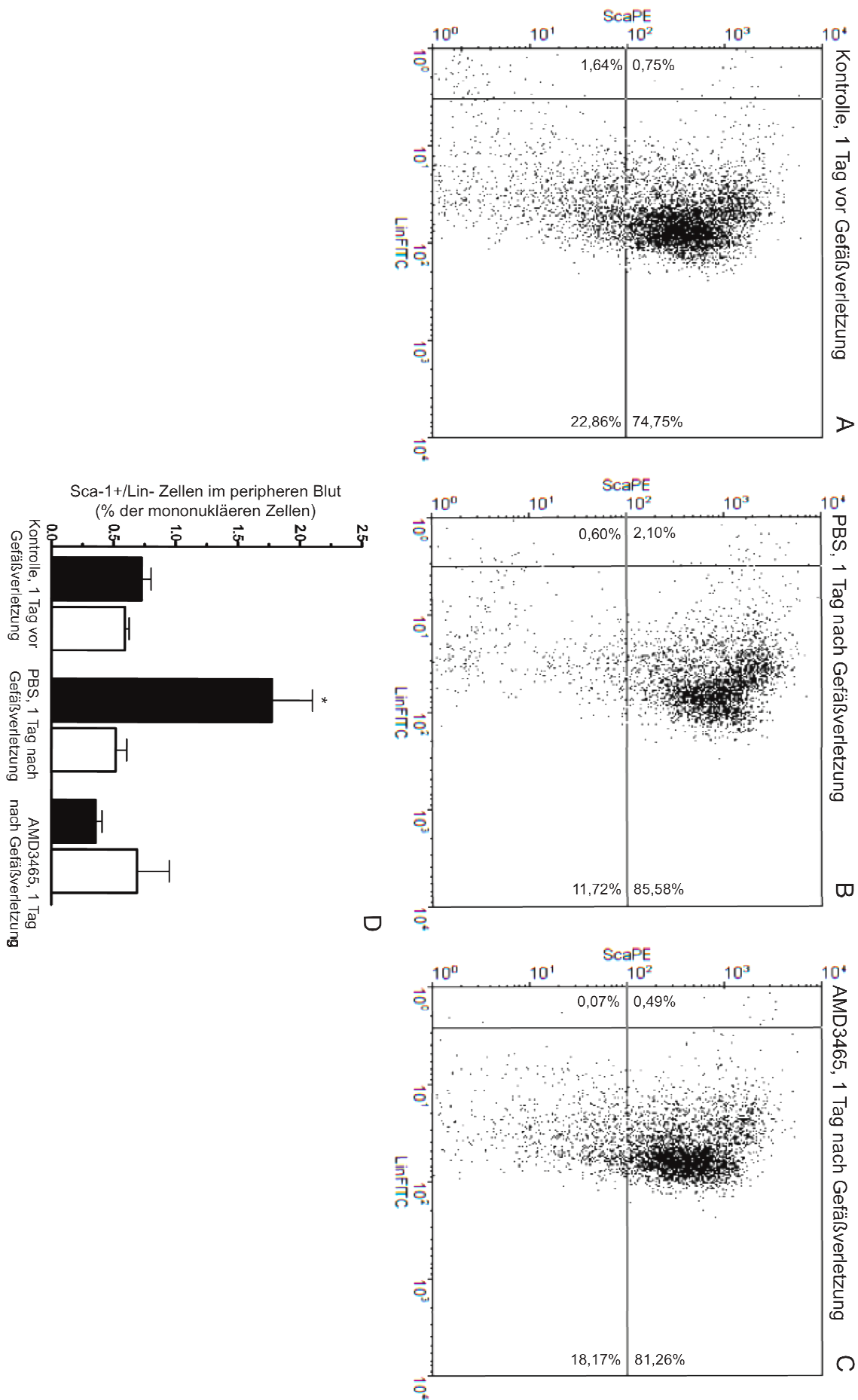


Abbildung 14: AMD3465 verhindert die Mobilisierung von Sca-1⁺/Lin⁻ Zellen im peripheren Blut nach der Gefäßverletzung. (A) Repräsentative Ergebnisse durchflusszytometrischer Quantifizierungen der Sca-1⁺/Lin⁻ Zellen vor der Gefäßverletzung (A, Kontrolle) und 24 h (B, C) nach der Gefäßverletzung in PBS (B) bzw. AMD3465-behandelten Mäusen (C). Während vor der Gefäßverletzung kein Unterschied des Anteils Sca-1⁺/Lin⁻ Zellen in beiden Gruppen vorhanden war, war der verletzungsbedingte Anstieg der Sca-1⁺/Lin⁻ Zellfraktion 24 h nach der Gefäßverletzung in der AMD3465-Gruppe nicht nachweisbar (D). Nach 28 Tagen waren der Anteil Sca-1⁺/Lin⁻ Zellen in der PBS-Gruppe auf die Ausgangswerte zurückgegangen (D). *P<0,001 verglichen mit allen anderen Zeitpunkten und Versuchsgruppen.

4.6 Ergebnissübersichtstabelle

		PBS-Gruppe	AMD3465-Gruppe	P-Wert	N/Gruppe
Neointimafläche (mm²)		0,05±0,006	0,02±0,006	<0,05	4
Mediafläche (mm²)		0,064±0,01	0,04±0,005	NS	4
Intima/Media Ratio		0,85±0,13	0,42±0,11	<0,05	4
α-SMA⁺/NI Ratio		0,37±0,06	0,16±0,03	<0,05	4
Mac-2⁺/NI Ratio		0,32±0,07	0,28±0,01	NS	4
Plaqueeigenschaften	Fläche des Lipidkerns (mm²)	0,01±0,002	0,002±0,0005	<0,05	4
	Dicke der fibrösen Kappe (µm)	43,6±2,3	23,8±6,1	<0,05	4
Reendothelialisierung (% der luminalen VE-Cadherin⁺-Zellen)	7 d	69,7±5,1	66,8±3,2	NS	4
	28 d	92,5±2,4	91,5±1,4	NS	4
Proliferationsrate (% der Gefäßwand Ki67⁺ Zellen)	7 d	3,4±0,7	1,4±0,4	<0,05	4
	28 d	1,7±0,4	1,0±0,3	NS	4
SPC-Mobilisation (% der Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen im peripheren Blut)	1 d vor der Gefäßverletzung	0,7±0,2	0,6±0,1	NS;	6
	1d nach der Gefäßverletzung	1,8±0,7 *	0,5±0,2	<0,001	5
	28 d nach der Gefäßverletzung	0,4±0,1	0,6±0,6	NS;	5

Tabelle 4: Ergebnisübersichtstabelle.

5 Diskussion

Die SDF-1 α /CXCR4-Achse reguliert die Entstehung einer neointimalen Hyperplasie nach der Gefäßverletzung durch die Rekrutierung von zirkulierenden Vorläuferzellen von SMC (SPC).³⁶ Die verletzungsbedingte Apoptose der SMC ist dabei wesentlich verantwortlich für die gesteigerte SDF-1 α Expression in der Gefäßwand.⁴⁰ Eine Inhibition der SDF-1 α / CXCR4 Achse nach Gefäßverletzung führte in mehreren Studien zu einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung und deren SMC-Gehaltes.^{36,40,95}

Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist an vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt.^{36,39,42,45,66,113} Außerdem ist CXCR4 ein essentieller Kofaktor der Infektion von CD4⁺ T-Zellen durch T-Zell-tropische HIV1 und HIV2, wodurch CXCR4 in den letzten zwei Dekaden als valides Ziel zur Entwicklung wirksamer Medikamente erforscht wurde.⁸⁷⁻⁹⁰ Daraus folgten die potenten kleinmolekularen CXCR4-Antagonisten Bicyclam AMD3100 und Monocyclam AMD3465.⁸⁷⁻⁹⁰

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob eine Therapie mit dem kleinmolekularen CXCR4-Antagonisten AMD3465 nach Induktion einer akzelerierten Atherosklerose durch CCA-Verletzung an ApoE^{-/-}-Mäusen die Neointimabildung durch eine selektive Hemmung der SMC-Akkumulation reduziert und damit eine klinische Option zur Prävention der Restenose darstellen könnte.

Die Untersuchungen zeigten, dass der AMD3465-Antagonismus am CXCR4 zu einer Reduktion der Neointimafläche und eines neointimalen SMC-Anteiles führte. Außerdem konnte die initiale SDF-1 α -abhängige Mobilisierung der SPC durch das AMD3465 verhindert werden. Daraus darf vermutet werden, dass eine verminderte SPC-Rekrutierung zu einer Reduktion des SMC-Anteiles der Neointima und somit zur kleineren Neointima führte. Konsekutiv konnte eine Woche nach der Verletzung der Gefäßwand ebenfalls eine Verminderung der Zellproliferation gezeigt werden.

Interessanterweise war die Reendothelialisierung durch die AMD3465-Behandlung unbeeinflusst.

Zusammenfassend präsentiert sich AMD3465 als ein potentes therapeutisches Mittel zur Hemmung der Restenose.

5.1 Das CXC Chemokin SDF-1 α und der Rezeptor CXCR4

SDF-1 α (CXCL12, preB-cell growth-stimulating factor, PBSF) gehört zu einer Gruppe von strukturell verwandten Proteinen, die eine chemotaktische Aktivität v. a. für hämatopoetische Zellen besitzen und deshalb als chemotaktische Zytokine (Chemokine) bezeichnet werden.⁴¹ Die Gruppe der Chemokine wird entsprechend der Position der ersten zwei eng benachbarten Cysteine in der Aminosäuresequenz unterschieden in CXC-, CC-, CX3C- und C-Chemokine. Es ist bekannt, dass die Chemokine eine wichtige Rolle bei der Wundheilung durch die Rekrutierung von zirkulierenden mononukleären Zellen in die verletzte Region spielen.^{60,61} SDF-1 α wurde ursprünglich als ein von stromalen Zellen des Knochenmarks sezerniertes Protein identifiziert.^{42,43} Obwohl die Primärstruktur SDF-1 α als CXC-Chemokin ausweist, ist die Aminosäuresequenz von SDF-1 α deutlich verschieden von anderen CXC- aber auch von CC-Chemokinen.⁴⁴ Die Funktionen von SDF-1 α unterscheiden sich ebenfalls von anderen Chemokinen: SDF-1 α ist weniger von Bedeutung bei proinflammatorischen Prozessen als vielmehr bei grundlegenden Funktionen der embryonalen Entwicklung und der Hämatopoese. Es wird konstitutiv in einer Vielzahl von Geweben wie Herz, Leber, Lunge, Gehirn, Skelettmuskel, Milz und Niere exprimiert.^{42,45,113} Der SDF-1 α Promoter enthält im Unterschied zu anderen CXC Chemokinen, wie z. B. growth-related oncogene- α (GRO- α) oder epithelial cell-derived neutrophil-activating protein-78 (ENA-78) keine Bindungsmotive für proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, NF-IL6 und activator protein-1 (AP-1).^{45,113} Die Struktur des SDF-1 α Promoters ist, passend zur konstitutiven Expression von SDF-1 α in zahlreichen Gewebetypen⁴⁵, vergleichbar mit der von „housekeeping genes“ mit Bindungsstellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1.¹¹³ Dennoch gibt es Hinweise dafür, dass die SDF-1 α Transkription unter dem

Einfluss von verschiedenen Stimuli, wie VEGF¹¹³, IL-1 β oder Bestrahlung, induziert werden kann.¹¹³

Die Effekte von Chemokinen werden durch eine Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranalen Domänen vermittelt.⁴⁶ Der CXCR4 (CXCR4) besitzt im Gegensatz zu den meisten anderen Chemokinrezeptoren mit SDF-1 α nur einen bekannten Liganden¹¹⁴ und wurde lange als einziger Rezeptor für SDF-1 α betrachtet, der primär aus Leukozyten kloniert⁴⁹ und funktionell als essentieller Kofaktor der Infektion von CD4⁺ T-Zellen durch T-Zell-tropische HIV1 und HIV2 erkannt wurde.^{50,51} In den letzten Jahren wurde ferner mit CXCR7 (syn. RDC1, CMKOR 1) ein weiterer Rezeptor für SDF-1 α identifiziert^{47,48}, der ein funktionales Heterodimer mit CXCR4 bilden kann und dadurch die Rezeptorfunktion steuert.¹¹⁵ Die Rolle von CXCR7 bei der SPC-Rekrutierung nach einer Gefäßverletzung ist bisher nicht untersucht worden. Es gibt jedoch Hinweise für eine differentielle Funktion von CXCR4 und CXCR7 beim „homing“ von renalen Progenitorzellen.¹¹⁵ Die Bindung von SDF-1 α an CXCR4 führt über eine Dimerisierung des Rezeptors⁵² zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Komponenten der Focal Adhesions⁵⁴, der extracellular signal regulated kinase-1 (ERK-1) und ERK-2⁴⁰, der Phospholipase C- γ (PLC- γ), der PKC sowie der PI3-K zur Folge haben. Ferner kommt es zur Aktivierung der Janus-Kinasen und des Janus-Kinasen/ signal transducers and activation of transcription (JAK/STAT) Transkriptionswegs⁵² sowie von NF- κ B (Abbildung 15).^{53,68}

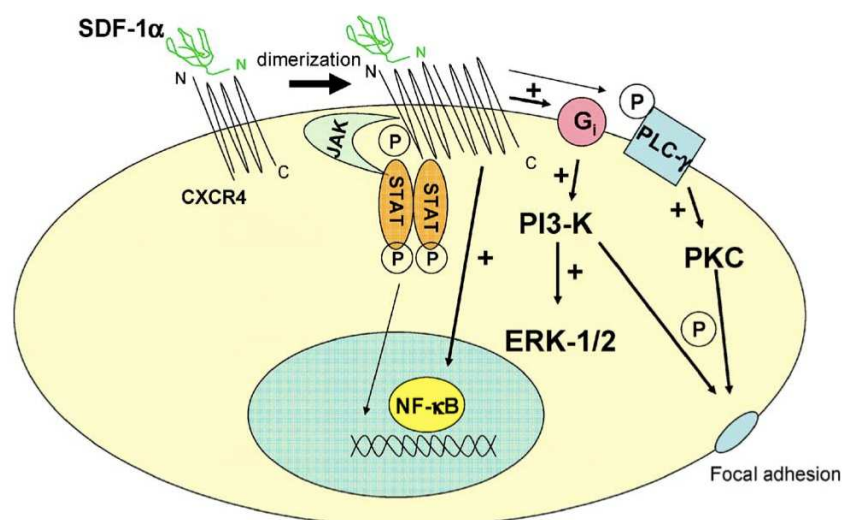


Abbildung 15: Mechanismen der Signaltransduktion durch SDF-1 α -CXCR4 Interaktion. Nach der Bindung von SDF-1 α an CXCR4 kommt es zur Rezeptordimerisierung und Aktivierung

von inhibitorischen G-Proteinen. Dies führt zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die eine gesteigerte Phosphorylierung von Komponenten der Focal Adhesions, der ERK-1 und ERK-2, der PLC- γ , der PKC sowie der PI3-K zur Folge hat. SDF-1 α induziert die nukleäre Translokation sowie Steigerung der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B. Ferner binden Janus Kinasen (JAKs) direkt an CXCR4 und werden durch Phosphorylierung aktiviert. Die phosphorylierten JAKs triggern die Aktivierung und die nukleäre Translokation von „signal transducers and activators of transcription“ (STAT).⁶⁸

SDF-1 α induziert effektiv über CXCR4 die Thrombozytenaggregation und die Calcium-Freisetzung in Thrombozyten.⁶⁶ Die Bestimmung der Plasmakonzentration von SDF-1 α in Patienten mit instabiler Angina Pectoris zeigte eine deutliche Reduktion im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina Pectoris oder gesunden Probanden. Dies ging einher mit einer verminderten CXCR4 Expression auf Monozyten und CD3-positiven T-Lymphozyten. Ein antiinflammatorischer Effekt des SDF-1 α im Rahmen der Koronarsklerose wurde ferner aus der Tatsache abgeleitet, dass SDF-1 α die Expression und Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen, wie MCP-1 aus mononukleären Zellen von Patienten mit instabiler Angina Pectoris, inhibiert.⁶⁶

5.2 Die SDF-1 α / CXCR4-Achse bei der Reparatur von Gewebeschädigung durch Stammzellen und deren Einfluss auf die Neointimabildung

Stammzellen aus hämatopoietischem Gewebe, wie Knochenmark und peripheres Blut, besitzen eine enorme Entwicklungskapazität, welche eine Reparatur von Schädigungen in verschiedenen Organen durch die gewebsspezifische Differenzierung dieser Zellen ermöglicht.¹¹⁶ Unmittelbar nach einer Gefäßverletzung kommt es zur Apoptose der Mehrzahl der medialen SMC.²⁰ Die Apoptoserate der SMC nach einer Schädigung steigt in Abhängigkeit von der Intensität der Verletzung an.¹¹⁷ Die Hemmung der SMC-Apoptose nach einer Gefäßverletzung führt zu einer Reduktion der Neointimabildung, was als Hinweis dafür gewertet werden kann, dass die Apoptose in der frühen Phase nach der Verletzung direkt die SMC-Akkumulation zur Regeneration der verletzten Region reguliert.^{118,119} Das bisher gültige Paradigma

der Restenoseentstehung ging davon aus, dass nicht-apoptotische SMC aus der Media proliferieren, ihren Phänotyp in Richtung eines „synthetischen Typs“ verändern bzw. dedifferenzieren und in die Intima migrieren.^{16,30,120} Heute ist jedoch bekannt, dass zusätzlich zu den lokal eingewanderten neointimalen SPC, SPC aus dem peripheren Blut rekrutiert werden und wesentlich zur neointimalen SMC-Population beitragen.^{31,121} Bei einer extensiven frühen Apoptose der Zellen sind die ortsansässigen VSMC nicht ausreichend für eine Reparatur, weswegen zirkulierende SPC benötigt werden.³⁹ Abgeschlossen wird die neointimale Reparatur durch die Freisetzung von extrazellulärer Matrix wie Kollagen Typ I aus neointimalen SMC und der Reendothelialisierung mit aktivierten Endothelzellen.^{122,123}

In verschiedenen tierexperimentellen Studien der Transplantatvaskulopathie mit Aorten bzw. heterotopen Herztransplantationen konnte nachgewiesen werden, dass mehr als 80% der neointimalen SMC aus den Empfängertieren, und damit nicht lokal aus der Media der Spenderorgane, abstammen.^{124,125} In der Studie nach intraluminaler Denudation wurde ferner weiblichen Mäusen das Knochenmark von männlichen Spendertieren transplantiert. Hierbei konnte nachgewiesen, dass die entstandene Neointima überwiegend aus SMC bestand, die zu etwa 50% auch Y-Chromosom-positiv waren und somit aus dem Knochenmark abstammten.³⁴ In Ratten stammten nach Knochenmarkstransplantation und Ballondilatation der CCA etwa 10-13% der neointimalen Zellen aus dem Knochenmark ab. Ein Teil dieser Zellen exprimierte sogar SMC-typische Marker α -SMA oder smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC).¹²⁶

Der Nachweis, dass adulte Stammzellen ($\text{Sca-1}^+/\text{lin}^-$) aus dem peripheren Blut auch tatsächlich SPC enthalten, wurde unter anderem in vivo nach Injektion dieser Zellen erbracht. Durch kombinierte in situ Hybridisierung und Immunhistologie konnte gezeigt werden, dass die injizierten $\text{Sca-1}^+/\text{lin}^-$ Zellen in die Neointima rekrutiert werden und dort α -SMA und SMMHC exprimieren.³⁶ Neben hämatopoetischen $\text{c-Kit}^+/\text{Sca-1}^+/\text{lin}^-$ Stammzellen²⁷ enthalten vor allem c-Kit-primitive und PDGFR- β -positive Knochenmarkszellen die SPC die nach einer Gefäßverletzung zur Neointimabildung beitragen.⁴⁰

Das CXC Chemokin SDF-1 α und sein Rezeptor CXCR4 regulieren entscheidend die Rekrutierung von Progenitorzellen bei der Reparatur verschiedener Organschädigungen. In einem Modell der toxischen Leberschädigung führt der

Anstieg der SDF-1 α Expression zu einem verstärkten CXCR4-abhängigem „homing“ von humanen CD34-positiven Progenitorzellen in die geschädigte Leber und deren Differenzierung in Hepatozyten.¹²⁷ Eine Leberschädigung durch Bestrahlung resultierte ebenfalls in einer vermehrten Rekrutierung von CD34-positiven Zellen, die durch CXCR4-Antikörper blockiert werden konnte.¹²⁷ Ferner führte die intramyokardiale Transplantation von transfizierten Fibroblasten, welche SDF-1 α überexprimieren, zu einer Zunahme der Rekrutierung von CD117-positiven Stammzellen nach G-CSF-Zugabe in das Myokard und zu einer Verbesserung der kardialen Funktion.¹²⁸

Nach einer Gefäßverletzung ist die SDF-1 α / CXCR4-Achse entscheidend verantwortlich für die Mobilisierung von SPC in die Zirkulation, für deren Rekrutierung in die verletzte Gefäßwand und damit auch für die Neointimabildung.^{68,129} SDF-1 α wird nach der Verletzung in medialen und neointimalen SMC verstärkt exprimiert und von aktivierten Thrombozyten freigesetzt.^{40,130}

In humanen atherosklerotischen Plaques ist die Expression von SDF-1 α in SMC, Endothelzellen und Makrophagen deutlich gesteigert, während man in normalen Arterien kein SDF-1 α nachweisen kann.⁶⁵ Die gesteigerte SDF-1 α Expression in der Gefäßwand nach einer Gefäßverletzung geht mit einem kurzfristigen Anstieg der SDF-1 α Konzentration im Plasma³⁶ einher, wodurch sich der SDF-1 α -Gradient zwischen Knochenmark und peripherem Blut verändert und SPC in die Zirkulation mobilisiert werden.^{68,131-133} Neben der Mobilisierung von SPC induziert die gesteigerte SDF-1 α -Expression in der verletzten Gefäßwand den Arrest von SPC auf den luminal-adhärierenden Thrombozyten in der Frühphase der Neointimabildung und fördert die Migration von SPC während des neointimalen Wachstums (Abbildung 16).^{36,68}

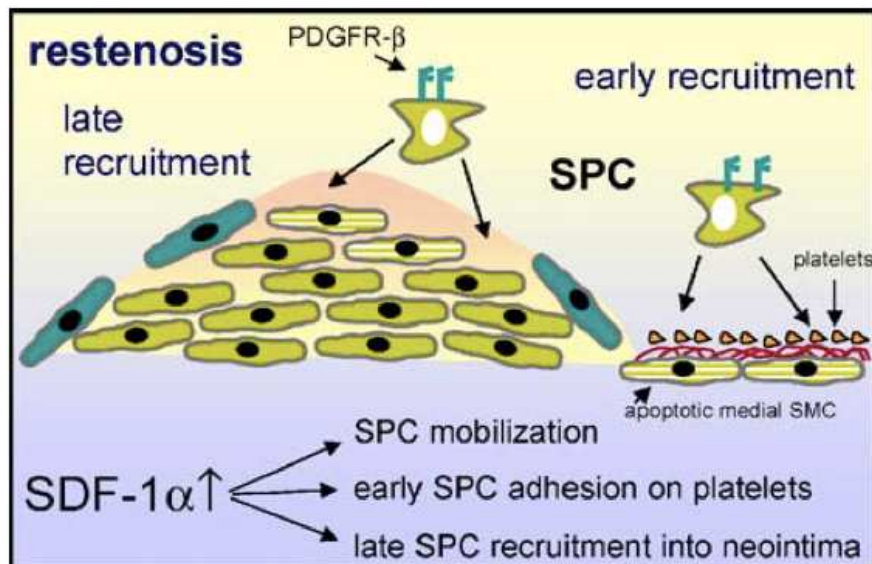


Abbildung 16: Schematische Darstellung der SDF-1 α -vermittelten Effekte auf SPC bei der Entstehung neointimaler Plaques. Neben der Mobilisierung von SPC in die Zirkulation durch erhöhte SDF-1 α Serumkonzentrationen, führt die gesteigerte neointimale SDF-1 α Expression in der Frühphase der Neointimabildung zur Adhäsion von SPC über Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand und ist während des neointimalen Wachstums wesentlich für die Rekrutierung von SPC verantwortlich.⁶⁸

Um die Rolle von SDF-1 α bei der Rekrutierung von SPC aus dem Knochenmark in die Neointima zu untersuchen, wurden ApoE^{-/-} Mäusen Knochenmarkszellen, die das β -Galaktosidase (LacZ) Gen exprimieren, transplantiert. Die Gabe eines SDF-1 α blockierenden Antikörpers für vier Wochen nach der Gefäßverletzung reduzierte die neointimale Fläche und die Population der neointimalen β -galactosidase-positiven SMC aus dem Knochenmark signifikant.⁴⁰

Eine Hemmung durch Deletion des Rezeptors CXCR4 oder lentiviraler SDF-1 α -Gentransfer inhibierte die neointimale Hyperplasie und die Rekrutierung von SPC im Mausmodell.^{36,40}

Ferner ist bekannt, dass SDF-1 α eine Rolle bei der Mobilisierung und Rekrutierung der SPC aus dem Knochenmark nach Transplantarteriosklerose spielt.⁶⁹ Die SDF-1 α Expression war in Adventitia und anschließend sowohl in der Media als auch in der Neointima von transplantierten murinen Aorten erhöht.⁶⁹

5.3 Kleinmolekulare CXCR4-Antagonisten

Das CXCR4 wird in vielen Zelllinien exprimiert und ist an der neonatalen Entwicklung, Hämatopoiese, Lymphozytenhomöostase^{44,134,135} und Mobilisation der hämatopoietischen Stammzellen beteiligt.^{136,137} Außerdem ist CXCR4 einer der Korezeptoren für den Zelleintritt der sog. X4-HIV-Stämme in die CXCR4 exprimierenden T-Helferzellen.^{50,138,139} Aufgrund dieser Erkenntnisse ist CXCR4 ein interessantes Ziel für die Entwicklung wirksamer Medikamente.

Der erste vorgestellte kleinmolekulare CXCR4-Antagonist war das Bicyclam AMD3100, ein potenter und selektiver CXCR4-Inhibitor mit symmetrischer molekularer Struktur (Abbildung 1). AMD3100 inhibiert eine Infektion der T-Zellen mit X4-Stämmen des HIV. Zusätzlich zeigte sich AMD3100 als effektiver Induktor der Mobilisierung von humanen hämatopoietischen Stammzellen.¹⁴⁰⁻¹⁴⁴ Mittlerweile ist AMD3100 als Plerixafor (MozobilTM) bekannt und bereits für die Freisetzung von HSC aus dem Knochenmark in die Blutbahn, zur Stammzellisolierung für eine autologe Stammzelltransplantation bei Patienten mit multiplen Myelom oder Non-Hodgkin-Lymphom in Kombination mit G-CSF zugelassen.⁹⁴

5.3.1 Monocyclam AMD3465 und seine Pharmakokinetik

Um die orale Bioverfügbarkeit von AMD3100 zu verbessern wurde das Monocyclam AMD3465 entwickelt (Abbildung 2). Obwohl das Wegfallen der makrozyklischen Struktur nicht zur erhofften Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit führte, konnte ein CXCR4 Antagonist mit einer verbesserten Aktivität entwickelt werden.^{87,88}

Die Rezeptorpharmakologie von AMD3465 wurde an einer Humane-Akute-Lymphozytische-Leukämie-Zell-Linie-Zellkultur (CCRF-CEM), welche CXCR4-exprimiert, untersucht.¹⁴⁵ Hierbei zeigte sich eine potente Inhibition der SDF-1 α -Bindung am CXCR4 und der nachfolgenden SDF-1 α -induzierten Zellantwort. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass AMD3465 ein spezifischer CXCR4-Inhibitor ist, ohne relevanter Interaktion mit weiteren Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR2b, CCR4, CCR5, CCR7, CXCR3 und Leukotrien B4 (LTB4).¹⁴⁵

Anhand der pharmakologischen Untersuchungen an Mäusen ist AMD3465 nach s.c. Injektion 100% bioverfügbar. Die maximal tolerierte Dosis betrug 50mg/kg und die Halbwertszeit 3,23h.¹⁴⁵

In der Phase I Studie induzierte Plerixafor eine schnelle und transiente Leukozytose sowie potente Mobilisierung der hämatopoietischen Stammzellen.¹⁴⁶ AMD3465 zeigte ähnliche Eigenschaften bezüglich der Leukozytenmobilisierung in drei verschiedenen Mäuse- und Hundestämmen.¹⁴⁵ Das Differentialblutbild stellte insbesondere eine Mobilisierung der Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten dar (Abbildung 17). An Mäusen konnte kein relevanter Unterschied in der Leukozytenmobilisierung zwischen einer Dosis von 2,5mg/kg und 10 mg/kg s.c. AMD3465 festgestellt werden. Nach einer den Hunden verabreichten Dosis von 2,05mg/kg AMD3465 s.c., konnte eine 1,7-fache Erhöhung der Leukozytenzahl im peripheren Blut für 4h p.i. gemessen werden. Die Spitze der Leukozytenmobilisierung konnte in Mäusen zwischen 0,5h-1h, und in Hunden nach 2-4h beobachtet werden.¹⁴⁵ Die Beobachtungen der Verzögerung der Leukozytenmobilisierung nach AMD3465 Injektion in Hunden sind mit den Beobachtungen der AMD3100-Kinetik konsistent.^{147,148}

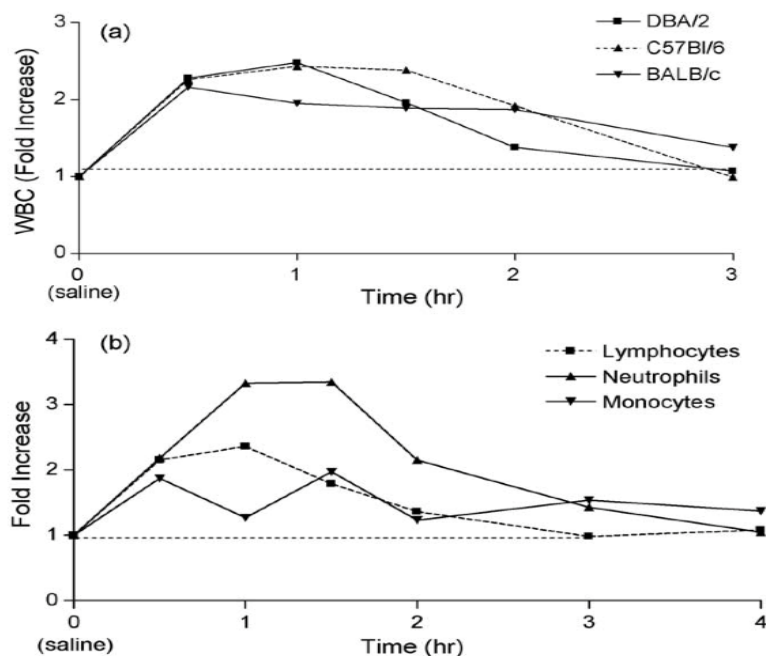


Abbildung 17: (a) Leukozytenmobilisation, (b) Neutrophilen-, Lymphozyten- und Monozytenanzahl im peripheren Blut nach 5 mg/kg AMD3456 s.c. in Mäusen. Die Neutrophilen, Lymphozyten und Monozytenanzahl ist am Beispiel einer DBA/2 Maus gezeigt. (N=3/Mausgruppe).¹⁴⁵

Im Gegensatz zum symmetrischen Bicyclam Plerixafor ist AMD3465 ein asymmetrisches Monocyclam. Einer der Cyclamringe wurde mit einem Aminomethylpyridin-Rest ausgetauscht. Trotz der Entfernung eines Cyclamrings konnte eine potente Inhibition des CXCR4 durch das AMD3465 erreicht werden.^{87,88,145} Die CXCR4-Inhibition durch das Plerixafor ist von den positiv geladenen Aminosäuren in den transmembranen Regionen TMIV, TMVI, D171, D262 und E283 abhängig.⁸⁸ Ähnliche Studien zeigten, dass die AMD3465-Bindung an den Rezeptor von o.g. Interaktionen ebenfalls abhängig ist. Zusätzlich konnte jedoch eine weitere signifikante Interaktion mit der H281-Domäne beobachtet werden, welche für die potentere Interaktion von AMD3465 und CXCR4 verantwortlich sein könnte.^{88,145,149}

Die o.g. Eigenschaften der potenten CXCR4 Inhibition durch das AMD3465, seine Pharmakokinetik sowie die Erkenntnisse der instrumentalen Rolle von CXCR4/SDF-1 α -Achse an der Neointimabildung, könnten daher eine attraktive therapeutische Option zur Prävention der SMC-Akkumulation in der Restenose darstellen.

5.4 Die AMD3465 Behandlung reduziert Neointimafläche und neointimalen SMC-Gehalt nach einer ACC-Verletzung in ApoE^{-/-}-Mäusen

Die SDF-1 α -Depletion durch einen monoklonalen Antikörper führte zu einer signifikanten Reduktion der Neointimafläche und der neointimalen SMC-Akkumulation durch die Inhibition der SPC Rekrutierung.³⁶ Eine besonders ausgeprägte Inhibition der Neointimabildung wurde in den chimären CXCR4-knochenmarksdefizienten Mäusen beobachtet.⁴⁰ Durch die kontinuierliche AMD3465-Gabe konnte in dieser Studie ein ähnlicher Effekt mit einer 59%-igen Reduktion der neointimalen Fläche erreicht werden. (Abbildung 9, Kapitel 4.1)

Die CXCR4-Inhibition durch das AMD3465 verringerte selektiv und signifikant die neointimale SMC-Akkumulation, ohne einen Einfluss auf die neointimalen Makrophagen zu haben (Abbildung 10, Kapitel 4.2.1). Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen aus der Literatur überein^{36,40,95} und bestätigen die bedeutende pathophysiologische Rolle des CXCR4 an der SPC-Rekrutierung und darauffolgender SMC-Akkumulation in dem verletzten Gefäßgebiet.

5.5 AMD3465 inhibiert die initiale Sca1⁺/Lin⁻ Zellenmobilisierung und neointimale Zellproliferation nach einer Gefäßverletzung

Eine Gefäßverletzung führte zu einem deutlichen Anstieg der Plasma-SDF-1 α -Konzentration mit einer Spitze nach 24h. Die Plasma-SDF-1 α -Konzentration ging nach ca. zwei Wochen zu ihren Ausgangswerten zurück.³⁶ Ein dadurch veränderter SDF-1 α -Gradient zwischen Knochenmark und Peripherie führte zu einer SPC-Expansion in das periphere Blut.^{68,131-133}

Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Gefäßverletzung führte zu einem signifikanten Anstieg der Sca-1⁺/Lin⁻ Zellen 24 h nach der Gefäßverletzung in der mit PBS behandelten Gruppe, wobei die CXCR4-Inhibition durch das AMD3465 die Sca-1⁺/Lin⁻-Zellexpansion in das periphere Blut initial blockierte. Nach vier Wochen konnte jedoch ein tendenziell höherer Anteil der Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen im peripheren Blut der mit AMD3465-behandelten Mäuse gemessen werden (Abbildung 14, Kapitel 4.5).

Interessanterweise konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine 12-wöchige kontinuierliche AMD3465-Gabe die native diät-induzierte Atherosklerose in ApoE^{-/-}-Mäusen aggravierte.⁶⁷ Hierbei konnte die Neutrophilenmobilisation und deren Rekrutierung in die atherosklerotische Läsionen als Hauptfaktor der Atheroskleroseaggravation identifiziert werden. Durch die längerfristige Neutrophilendepletion mittels eines monoklonalen AK konnte die Exazerbation der atherosklerotischen Plaques in ApoE^{-/-}-Mäusen rückgängig gemacht werden. Zusätzlich konnte eine Expansion der Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen im peripheren Blut der AMD3465 behandelten Mäuse beobachtet werden.⁶⁷

Der Unterschied im beobachteten Anteil der Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen im peripheren Blut zwischen der akzelerierten und nativen Atherosklerose, könnte durch die hohe SDF-1 α -Plasmakonzentration 24h nach Gefäßverletzung³⁶ erklärt werden. Hierbei könnte die Veränderung des SDF-1 α -Gradients zwischen dem Knochenmark und der Peripherie ursächlich für die initiale Inhibition der Mobilisation der Sca-1⁺/Lin⁻-Stammzellen sein.

Anhand der Ki-67-Immunofluoreszenz zeigte sich eine signifikant reduzierte Zellproliferation unter AMD3465 sieben Tage nach der Gefäßverletzung (Abbildung

13), die vermutlich sekundär durch die geringere Rekrutierung von Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen zu erklären ist. Die Ergebnisse der initialen Inhibition der Sca-1⁺/Lin⁻-Zellexpansion sowie verminderter Zellproliferation unter CXCR4-Blockade, bestätigen die Bedeutung der SDF-1α/ CXCR4-Achse an der Neointimabildung durch Rekrutierung der SPC in das verletzte Gebiet.

5.6 SDF-1α-Auswirkungen auf Plaquestabilität und Plaqueeigenschaften unter AMD3465-Behandlung

SDF-1α wird in den humanen atherosklerotischen Plaques verstärkt exprimiert und hohe SDF-1α-Plasmaspiegel sind klinisch mit einer stabilen KHK korreliert, wodurch eine anti-inflammatorische Rolle von SDF-1α vermutet werden kann.⁶⁶ Eine neuere Genomweite-Assoziationsstudie identifizierte eine Mutation am Chromosom 10q11 in der Nähe des SDF-1α-Gens als starken Prädiktor für eine KHK und implizierte somit die protektive Rolle des Chemokins SDF-1α.¹⁵⁰

Stabile atherosklerotische Läsionen haben oft eine dicke fibröse Kappe und sind meist bereits fortgeschritten. Die instabilen Plaques sind oft nicht stenosierend und besitzen eine dünne fibröse Kappe.⁹ Die kontinuierliche Rekrutierung von Makrophagen, welche vermehrt Metalloproteinasen und weitere proeolytische Enzyme sezernieren, führt zu einer Ausdünnung der fibrösen Kappe sowie einer Vergrößerung des Nekrosekerns und somit zu vermehrter Plaqueinstabilität.^{5,9}

Der Makrophagengehalt in der Neointima wurde durch die AMD3465-Behandlung nicht beeinflusst, wohingegen die Evaluation der Plaqueeigenschaften eine schwächere Formation der SMC-fibrösen-Kappe und eine kleinere Lipidkernfläche in der AMD3465-behandelten Gruppe zeigte.

Da die neointimale SMC-Akkumulation nach einer Gefäßverletzung eine Neointimabildung fördert, kann spekuliert werden, ob in die Neointima rekrutierten SPC zu einem stabileren und SMC-reicheren atheromatösen Plaque führen können.¹⁵¹

Ob eine dünne fibröse Kappe zusammen mit dem unveränderten Makrophagenanteil der Neointima unter AMD3465 gleichzeitig einen instabilen Plaque repräsentiert, geht aus den Daten dieser Studie nicht hervor und Bedarf weiterer Klärung.

5.7 Die Reendothelialisierung wurde durch die AMD3465-Behandlung nicht beeinflusst

Die Gefäßverletzung führt zur Zerstörung des antithrombogenen, einschichtigen Endothels und somit zur Demaskierung der darunter liegenden prothrombogenen Strukturen wie z.B. Kollagen. Die anschließende Thrombozytenaggregation leitet die Entstehung der Neointima ein (Abbildung 16).^{17,19} Die nachfolgende Endothelregeneration erfolgt durch Teilung der noch residenten Endothelzellen im verletzten Gebiet sowie Differenzierung der Stammzellen aus der Gefäßwand und dem peripheren Blut^{106,152,153}, wobei die Bedeutung der EPC-basierten Reendothelialisierung mit der Schwere der Gefäßverletzung zunimmt.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Im ApoE^{-/-}-Maus-Versuchsmodell der nativen Atherosklerose führte die Behandlung mit EPC zu einer aggravierten Atherosklerose.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Im Gegensatz dazu förderte die Behandlung mit EPC nach erfolgter ballon- bzw. draht-induzierter akzelerierter Atherosklerose die Reendothelialisierung durch direkte Inkorporation der EPC in das Endothel. Die dadurch geförderte Reendothelialisierung führte zu einer reduzierten Neointimabildung¹⁶⁰ und könnte daher ein nützliches therapeutisches Instrument für die Prävention der Stent-Thrombose nach PCI präsentieren.⁸²

Somit war es in dieser Arbeit von Interesse, eine mögliche Beeinflussung der vermutlich schützenden Reendothelialisierung durch die AMD3465-Behandlung zu untersuchen. Anhand der morphometrischen Auswertung der luminalen VE-Cadherin-Anfärbung blieb die Endothelialisierung während der Behandlung unbeeinflusst und zeigte bereits nach einer Woche eine ca. 70%-ige, und nach vier Wochen eine über 90%-ige Reendothelialisierung der verletzten Gefäßabschnitte. Eine Hemmung von CXCR4 hatte somit keinen Einfluss auf die Reendothelialisierung.

Diese Ergebnisse sind mit den publizierten Daten konsistent und deuten auf eine eher untergeordnete Rolle der SDF-1α/ CXCR4-Achse an der EPC-Rekrutierung in

die verletzten Gefäße. Eine Inhibition des keratinocyten-derived Chemokins (KC) führte zu einer verzögerten Reendothelialisierung und exacerbiertem Neointimabildung nach einer Drahtverletzung der CCA in ApoE^{-/-} Mäusen.¹⁶¹ Der KC Rezeptor CXCR2 konnte als wichtiger Faktor in der Regulation der EPC-Rekrutierung identifiziert werden.^{106,162} Es wird vermutet, dass SDF-1α die EPC mobilisieren kann und dass Integrine mit Chemokinrezeptoren, insbesondere mit CXCR2, in einen komplexen Prozess die EPC-Rekrutierung steuern können.¹⁰⁶

5.8 Aussichten und klinische Relevanz

Die koronare Herzerkrankung (KHK) und der akute Myokardinfarkt (AMI) stehen weltweit an erster Stelle der Todesursachen. Die therapeutischen Anstrengungen, v. a. die perkutane Koronarintervention (PCI), welche die bevorzugte Behandlungsmethode des AMI darstellt, führten in den letzten Dekaden in den USA und westlichen europäischen Ländern zu einer deutlichen Reduktion der KHK-bezogenen Mortalität und Morbidität.^{2,163}

Eine PCI wurde initial in Form einer Ballonangioplastie verwendet, welche jedoch eine hohe Restenoserate (> 50%) aufweist.¹⁶⁴ Die Einführung der „bare metal stents“ (BMS) konnte die Restenoserate in Vergleich zur Ballonangioplastie deutlich senken.^{163,165} Es blieben aber immerhin noch Restenoseraten von 15-20%. Einen Durchbruch brachte der Einsatz von „drug-eluting-stents“ (DES), welche die Häufigkeit der Restenose und somit auch der Reintervention auf unter 10% senken konnte.⁷⁹ DES sind mit antiproliferativen Substanzen (z.B. Paclitaxel und Sirolimus) beschichtet, welche nach Implantation in die Gefäßwand abgegeben werden. Ziel dieser Substanzen ist die Hemmung der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, welche einen pathogenetischen Hauptfaktor der Restenose darstellen.⁷⁹

Eine weitere gefürchtete Komplikation der PCI, verbunden mit hoher Mortalität, ist die In-Stent-Thrombose (IST). Bereits bei der BMS-Implantation konnte dieses Problem beobachtet werden. Durch die Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmer (Clopidogrel, Ticlopidin) in Kombination mit Acetylsalicylsäure (ASS) konnte die Häufigkeit der Stent-Thrombosen auf unter 1% gesenkt werden.¹⁶⁶ Die meisten BMS-

Thrombosen ereigneten sich in den ersten zehn Tagen und eine späte IST („late stent thrombosis“, LST) konnte lediglich in 0,2% der Fälle beobachtet werden.¹⁶⁶

Im Unterschied zur Restenose konnte die LST durch den Einsatz von DES im Vergleich zu BMS nicht gesenkt werden. Einige Studien legen sogar nahe, dass die DES-Thromboserate gegenüber BMS höher ist. Vielmehr könnten die DES verglichen mit BMS eine etwas erhöhte Rate an LST aufweisen.^{83,111,112} Als pathophysiologisches Korrelat zur Entstehung einer späten Stentthrombose wird die mangelnde Endothelialisierung der Stents diskutiert.⁸² In einer Autopsiestudie an Pat. mit Z.n. DES-Implantation und einem Todeszeitpunkt über 30 Tage nach der Stentimplantation, konnte das Verhältnis von nicht-endothelialisierten Stentstreben zur Gesamtzahl der Stentstreben, als ein guter morphometrischer Prädiktor einer LST gezeigt werden.⁸² Weitere Studien zeigten, dass DES-Beschichtungssubstanzen wie Sirolimus und Paclitaxel zu einer Steigerung der Tissue factor-Aktivierung führen (TF, ein Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade), wodurch eine lokal erhöhte prothrombotische Aktivität entstehen könnte.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

Somit wäre es von Interesse neue therapeutische Ansätze zu finden welche die Restenose hemmen und gleichzeitig die vermutlich protektive Reendothelialisierung nicht behindern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die instrumentale Rolle der SDF-1 α / CXCR4-Achse an der Neointimabildung in akzelerierter Atherosklerose und deuten darauf hin, dass die SDF-1 α / CXCR4-gesteuerte Rekrutierung der vaskulären Progenitorzellen ein potentiell therapeutisches Ziel zur Hemmung der Restenose sein könnte.

Unter Vorbehalt der möglichen Wirkung auf die Plaqueinstabilität und native Atherosklerose, könnte AMD3465 ein adäquates Präparat für eine kurzzeitige, a.e. lokale (z.B. durch DES) Applikation zur Verhinderung einer Restenose nach Revaskularisation sein. Ein möglicher Vorteil hierbei ist keine Beeinflussung der vermutlich schützenden Reendothelialisierung durch das AMD3465, wodurch eventuell eine kostenintensive und risikoreiche doppelte Thrombozytenaggregationshemmung nur kurzzeitig nötig wäre.

6 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen (koronare Herzkrankheit, ischämischer Schlaganfall und die Folgen einer peripherer Verschlusskrankheit) sind die häufigsten Ursachen für den Tod und Invalidität in der westlichen Welt. Gesamtinzidenz und -prävalenz dieser Erkrankungen steigen aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung der Weltbevölkerung und der Verbreitung des westlichen Lebensstils in den Entwicklungsländern. Die Grunderkrankung ist in den meisten Fällen die Atherosklerose mit Ausbildung von atherosklerotischen Plaques, die zu einer Stenosierung, Ruptur oder einem thrombotischen Verschluss des Gefäßes führen. Dadurch kann es zu einer kritischen Reduktion des Blutflusses kommen und nachfolgend zu typischen klinischen Beschwerden wie Angina pectoris, Myokardinfarkt, zerebraler Infarkt, Niereninsuffizienz oder periphere arterielle Verschlusskrankheit.

Die zentrale Therapieform von stenosierte oder verschlossenen Arterien ist die perkutane transluminale Angioplastie (PTA), bei der durch intraluminalen Druck der stenosierte Gefäßabschnitt aufgedehnt wird. Eine wesentliche Limitation des Langzeiterfolgs dieser Therapie ist die Restenose, eine erneute Verengung einer stenosierte, atherosklerotischen Arterie in den ersten Monaten nach der Intervention. Während nach perkutaner transluminaler koronarer Angiographie (PTCA) das negative Remodelling und die neointimale Hyperplasie zum Lumenverlust beitragen, ist bei der Stentimplantation über 90% des Lumenverlustes auf die Neointimabildung zurückzuführen.

Histologisch besteht die humane Neointima überwiegend aus glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) (bis zu 50%), sowie Makrophagen und extrazellulärer Matrix. Die bisherige Hypothese ging davon aus, dass die neointimalen SMC aus der lokalen Mediawand einwandern und in der Neointima proliferieren. Aufgrund dieser pathophysiologischen Erkenntnisse konnte die Rate an Restenosen nach angioplastischen Interventionen durch die Beschichtung der Stents mit antiproliferativen Substanzen (sog. drug-eluting stents DES) drastisch reduziert

werden. Es wurde jedoch berichtet, dass die antiproliferative DES-Wirkung zu einer unvollständigen endothelialen Bedeckung (Reendothelialisierung) der Stentstreben, und somit zu einer möglichen späten In-Stentthrombose (LST), führen kann. Eine LST ist für die betroffenen mit einer hohen Morbidität und Letalität verbunden und meist mit ungenügender Reendothelialisierung korreliert.

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass der Hauptanteil der neointimalen SMC aus einem adulten Stammzellenpool des Knochenmarks stammt und diese permanent als Vorläuferzellen von SMC im peripheren Blut zirkulieren. In verschiedenen Tierversuchsmodellen konnten, zirkulierende glatte Gefäßmuskel-Progenitorzellen (SPC), insbesondere die Stammzellen mit stem cell antigen 1 positiven und Lineage-Marker negativen Eigenschaften ($\text{Sca-1}^+/\text{Lin}^-$), als eine wichtige Quelle der neointimalen SMC nach einer Gefäßverletzung identifiziert werden. Die Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass die Mobilisation und Rekrutierung der SPC in die Neointima nach einer Gefäßverletzung hauptsächlich durch das Chemokin stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α , CXCL12) und seinem Rezeptor CXC-Rezeptor 4 (CXCR4) reguliert werden. In unterschiedlichen Studien reduzierte die Inhibition der SDF-1 α /CXCR4-Achse eine überschießende Neointimabildung und könnte somit eine interessante therapeutische Option zur Hemmung einer neointimalen SMC-Akkumulation und daher auch der Restenose sein.

In dieser Studie wurde an ApoE-defizienten Mäusen ($\text{ApoE}^{-/-}$) die Wirkung des CXCR4-Antagonisten AMD3465 und sein mögliches Potential zur Hemmung einer Neointimabildung nach endothelialer Denudation der A. carotis communis (CCA) untersucht. Ferner wurde der Einfluss von AMD3465 auf die inflammatorische Zellrekrutierung nach einer mechanischen Gefäßverletzung und die Zellproliferation in der Neointima untersucht. Entsprechend der Vorstellung, dass AMD3465 spezifisch die SMC-Akkumulation in der Neointima hemmt, wurde die Hypothese verfolgt, dass keine Änderung des Makrophagenanteils an den neointimalen Zellen mit der AMD3465-Behandlung auftritt. Die SDF-1 α -vermittelte Mobilisierung von $\text{Sca-1}^+/\text{Lin}^-$ SPC nach Drahtverletzung der A. carotis ist wesentlich für die neointimale SMC Akkumulation. Es wurde deshalb die Auswirkung einer AMD3465-vermittelten CXCR4-Blockade auf den Anteil der zirkulierenden SPC nach der Gefäßverletzung analysiert.

Kleinmolekulare CXCR4-Antagonisten, wie AMD3100 (Plerixafor, MozobilTM) und AMD3465, sind initial als Medikamente zur Bekämpfung der Infektion mit Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) entwickelt worden und sind potente Inhibitoren der nachgeschalteten CXCR4-Auswirkungen.

Als Tiermodell der Restenose wurden in der vorliegenden Arbeit weibliche ApoE^{-/-} Mäuse verwendet. Die Mäuse bekamen eine cholesterinreiche Nahrung und kontinuierlich 6 mg/kg/d AMD3465 über die mini-osmotischen Pumpen. Als Kontrolle wurde phosphat-gepufferte Kochsalzlösung über die Minipumpe verabreicht. Einen Tag nach der Pumpenimplantation erfolgte, nach einer vorübergehenden Unterbrechung der Blutzirkulation, die Gefäßverletzung der linken CCA durch einen Angioplastie-Führungsdraht.

Nach vier Wochen erfolgte die Euthanasierung der Tiere und die Präparate wurden entnommen. Die neointimalen und medialen Flächen wurden in Movat-Pentachrom-angefärbten CCA ausgemessen und die zelluläre Zusammensetzung für SMC und Makrophagen durch quantitative Immunhistologie (IH) bzw. Immunofluoreszenz (IF) ausgewertet.

Um die Mobilisierung der zirkulierenden Sca-1⁺/Lin⁻ SPC in das periphere Blut nach Gefäßverletzung zu untersuchen, wurden diese Zellen im peripheren Blut vor-, 24 h sowie 28 Tage nach dem Eingriff, durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung mit AMD3465, verglichen mit der PBS-Behandlung, zu einer 59%igen signifikanten Reduktion der Neointimabildung und tendenzieller Reduktion der Mediafläche führte.

Die quantitative Immunohistochemie für SMC zeigte einen um 57% geringeren neointimalen Anteil an SMC in AMD3465-behandelten Mäusen. Dahingegen war der neointimale Anteil an Makrophagen durch AMD3465-Behandlung unverändert.

Die Untersuchung der Reendothelialisierung, durch luminale vascular-endothelial Cadherin-Immunofluoreszenzfärbung sieben und 28 Tage nach der Gefäßverletzung zeigte jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Zellproliferation wurde mit Ki67-IF untersucht. Hierbei konnte nach sieben Tagen eine verminderte Zellproliferation in der AMD3465-Gruppe festgestellt werden.

Die durchflusszytometrischen Messungen 24 h nach der Gefäßverletzung ergaben eine erhöhte Mobilisierung der Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen in der PBS-Gruppe, wohingegen

die AMD3465-Behandlung zu einer signifikanten Inhibition der verletzungsbedingten Sca-1⁺/Lin⁻-Mobilisation führte. Nach vier Wochen ging der Anteil der zirkulierenden Sca-1⁺/Lin⁻-Zellen auf ihre Ausgangswerte zurück, jedoch war dieser in der AMD3465-Gruppe tendenziell höher.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die entscheidende Rolle des Chemokins SDF-1 α und seines Rezeptors CXCR4 an der Pathophysiologie der akzelerierten Atherosklerose. Die beiden Partner tragen zum großen Teil der neointimalen SMCs durch Mobilisierung und Rekrutierung von SPCs in die Neointima bei. Durch die Inhibition von CXCR4 mit AMD3465 konnte eine überschießende Neointimabildung nach einer Gefäßverletzung im Versuchsmodell der akzelerierten Atherosklerose verhindert werden. Vielmehr hat eine AMD3465-Therapie durch die selektive Wirkung am CXCR4 die vermutlich schützende Reendothelialisierung nicht behindert.

Somit präsentiert sich die Inhibition des CXCR4 durch das AMD3465 als ein potentiell therapeutisches Mittel zur Hemmung der Restenose nach einer Revaskularisation z.B. durch kurzzeitige systemische Gabe bzw. Stentbeschichtung mit AMD3465. Vorteil hierbei wäre keine Beeinträchtigung der Reendothelialisierung, so dass eine risikoreiche und kostenintensive doppelte Thrombozytenaggregationshemmung zur Verhinderung einer LST eventuell nur kurzzeitig notwendig wäre.

7 Referenzen

1. Fuster, V., Epidemic of cardiovascular disease and stroke: the three main challenges. Presented at the 71st scientific sessions of the American Heart Association. Dallas, Texas. *Circulation*, 1999. 99(9): p. 1132-7.
2. Mackay J., M.G., *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. World Health Organization, 2004.
3. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 801-9.
4. Lusis, A.J., Atherosclerosis. *Nature*, 2000. 407(6801): p. 233-41.
5. Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002. 420(6917): p. 868-74.
6. Ip, J.H., et al., Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol*, 1990. 15(7): p. 1667-87.
7. Hansson, G.K. and P. Libby, The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(7): p. 508-19.
8. Glass, C.K. and J.L. Witztum, Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 2001. 104(4): p. 503-16.
9. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.
10. Gruntzig, A.R., A. Senning, and W.E. Siegenthaler, Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med*, 1979. 301(2): p. 61-8.
11. Ruygrok, P.N., et al., Clinical and angiographic factors associated with asymptomatic restenosis after percutaneous coronary intervention. *Circulation*, 2001. 104(19): p. 2289-94.

12. Arjomand, H., et al., Percutaneous coronary intervention: historical perspectives, current status, and future directions. *Am Heart J*, 2003. 146(5): p. 787-96.
13. Detre, K., et al., Percutaneous transluminal coronary angioplasty in 1985-1986 and 1977-1981. The National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *N Engl J Med*, 1988. 318(5): p. 265-70.
14. Forrester, J.S., et al., A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol*, 1991. 17(3): p. 758-69.
15. Ferns, G.A. and T.Y. Avades, The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *Int J Exp Pathol*, 2000. 81(2): p. 63-88.
16. Schwartz, S.M., The intima : A new soil. *Circ Res*, 1999. 85(10): p. 877-9.
17. Komatsu, R., et al., Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation*, 1998. 98(3): p. 224-33.
18. Poon, M., J.J. Badimon, and V. Fuster, Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet*, 2002. 359(9306): p. 619-22.
19. Liu, M.W., et al., Reduction of thrombus formation without inhibiting coagulation factors does not inhibit intimal hyperplasia after balloon injury in pig coronary arteries. *Coron Artery Dis*, 1996. 7(9): p. 667-71.
20. Perlman, H., et al., Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation*, 1997. 95(4): p. 981-7.
21. Cirillo, P., et al., Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. *Cardiovasc Res*, 1999. 43(1): p. 210-8.
22. Chong, H., et al., Immunocytochemical localization of latent transforming growth factor-beta1 activation by stimulated macrophages. *J Cell Physiol*, 1999. 178(3): p. 275-83.
23. Ferns, G.A., et al., Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*, 1991. 253(5024): p. 1129-32.

24. Ge, J., et al., Elevated matrix metalloproteinase expression after stent implantation is associated with restenosis. *Int J Cardiol*, 2006. 112(1): p. 85-90.
25. Katsaros, K.M., et al., Increased restenosis rate after implantation of drug-eluting stents in patients with elevated serum activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *JACC Cardiovasc Interv.* 3(1): p. 90-7.
26. Ikeda, U. and K. Shimada, Matrix metalloproteinases and coronary artery diseases. *Clin Cardiol*, 2003. 26(2): p. 55-9.
27. Farb, A., et al., Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation*, 1999. 99(1): p. 44-52.
28. Farb, A., et al., Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*, 2002. 105(25): p. 2974-80.
29. Virmani, R. and A. Farb, Pathology of in-stent restenosis. *Curr Opin Lipidol*, 1999. 10(6): p. 499-506.
30. Schwartz, S.M., D. deBlois, and E.R. O'Brien, The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*, 1995. 77(3): p. 445-65.
31. Sata, M., et al., Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*, 2002. 8(4): p. 403-9.
32. Simper, D., et al., Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*, 2002. 106(10): p. 1199-204.
33. Caplice, N.M., et al., Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(8): p. 4754-9.
34. Han, C.I., G.R. Campbell, and J.H. Campbell, Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res*, 2001. 38(2): p. 113-9.
35. Shimizu, K., et al., Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med*, 2001. 7(6): p. 738-41.

36. Schober, A., et al., Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2003. 108(20): p. 2491-7.
37. Tanaka, K., et al., Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res*, 2003. 93(8): p. 783-90.
38. Xu, Y., et al., Role of bone marrow-derived progenitor cells in cuff-induced vascular injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(3): p. 477-82.
39. Schober, A. and A. Zernecke, Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost*, 2007. 97(5): p. 730-7.
40. Zernecke, A., et al., SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*, 2005. 96(7): p. 784-91.
41. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 675-705.
42. Tashiro, K., et al., Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, 1993. 261(5121): p. 600-3.
43. Nagasawa, T., H. Kikutani, and T. Kishimoto, Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(6): p. 2305-9.
44. Bleul, C.C., et al., A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*, 1996. 184(3): p. 1101-9.
45. Shirozu, M., et al., Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, 1995. 28(3): p. 495-500.
46. Horuk, R., Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001. 12(4): p. 313-35.
47. Balabanian, K., et al., The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 2005. 280(42): p. 35760-6.

48. Burns, J.M., et al., A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, 2006. 203(9): p. 2201-13.
49. Loetscher, M., et al., Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem*, 1994. 269(1): p. 232-7.
50. Feng, Y., et al., HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 1996. 272(5263): p. 872-7.
51. Deng, H., et al., Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 1996. 381(6584): p. 661-6.
52. Vila-Coro, A.J., et al., The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J*, 1999. 13(13): p. 1699-710.
53. Ganju, R.K., et al., The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 1998. 273(36): p. 23169-75.
54. Wang, J.F., I.W. Park, and J.E. Groopman, Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood*, 2000. 95(8): p. 2505-13.
55. Tilton, B., et al., Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med*, 2000. 192(3): p. 313-24.
56. Sotsios, Y., et al., The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol*, 1999. 163(11): p. 5954-63.
57. Signoret, N., et al., Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol*, 1997. 139(3): p. 651-64.

58. Tarasova, N.I., R.H. Stauber, and C.J. Michejda, Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *J Biol Chem*, 1998. 273(26): p. 15883-6.
59. Springer, T.A., Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 1994. 76(2): p. 301-14.
60. Gerard, C. and B.J. Rollins, Chemokines and disease. *Nat Immunol*, 2001. 2(2): p. 108-15.
61. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*, 2006. 354(6): p. 610-21.
62. Mohle, R., et al., The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 1998. 91(12): p. 4523-30.
63. Hidalgo, A., et al., Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*, 2001. 29(3): p. 345-55.
64. Lataillade, J.J., et al., Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*, 2000. 95(3): p. 756-68.
65. Abi-Younes, S., et al., The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res*, 2000. 86(2): p. 131-8.
66. Damas, J.K., et al., Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation*, 2002. 106(1): p. 36-42.
67. Zernecke, A., et al., Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res*, 2008. 102(2): p. 209-17.
68. Schober, A., et al., SDF-1alpha-mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine? *Trends Cardiovasc Med*, 2006. 16(4): p. 103-8.

69. Sakihama, H., et al., Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis. *Circulation*, 2004. 110(18): p. 2924-30.
70. Yamani, M.H., et al., Peritransplant ischemic injury is associated with up-regulation of stromal cell-derived factor-1. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(6): p. 1029-35.
71. Ceradini, D.J., et al., Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 2004. 10(8): p. 858-64.
72. Park, J.W., Y.S. Chun, and M.S. Kim, Hypoxia-inducible factor 1-related diseases and prospective therapeutic tools. *J Pharmacol Sci*, 2004. 94(3): p. 221-32.
73. Gorlach, A., et al., Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res*, 2001. 89(1): p. 47-54.
74. Page, E.L., et al., Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem*, 2002. 277(50): p. 48403-9.
75. Albina, J.E., et al., HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 281(6): p. C1971-7.
76. Frede, S., et al., Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J*, 2006. 396(3): p. 517-27.
77. Schober, A., et al., Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. *Circ Res*, 2004. 95(11): p. 1125-33.
78. Karshovska, E., et al., Expression of HIF-1alpha in injured arteries controls SDF-1alpha mediated neointima formation in apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(12): p. 2540-7.

79. Serruys, P.W., M.J. Kutryk, and A.T. Ong, Coronary-artery stents. *N Engl J Med*, 2006. 354(5): p. 483-95.
80. Moses, J.W., et al., Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*, 2003. 349(14): p. 1315-23.
81. Stone, G.W., et al., A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2004. 350(3): p. 221-31.
82. Finn, A.V., et al., Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation*, 2007. 115(18): p. 2435-41.
83. Daemen, J., et al., Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study. *Lancet*, 2007. 369(9562): p. 667-78.
84. Kastrati, A., et al., Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med*, 2007. 356(10): p. 1030-9.
85. Mehta, S.R., et al., Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet*, 2001. 358(9281): p. 527-33.
86. Bhatt, D.L., et al., Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med*, 2006. 354(16): p. 1706-17.
87. Hatse, S., et al., AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 2005. 70(5): p. 752-61.
88. Rosenkilde, M.M., et al., Molecular mechanism of action of monocyclam versus bicyclam non-peptide antagonists in the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem*, 2007. 282(37): p. 27354-65.
89. De Clercq, E., et al., Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. 38(4): p. 668-74.
90. Donzella, G.A., et al., AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med*, 1998. 4(1): p. 72-7.

91. Flomenberg, N., J. DiPersio, and G. Calandra, Role of CXCR4 chemokine receptor blockade using AMD3100 for mobilization of autologous hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol*, 2005. 114(4): p. 198-205.
92. Broxmeyer, H.E., et al., Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*, 2005. 201(8): p. 1307-18.
93. Fricker, S.P., A novel CXCR4 antagonist for hematopoietic stem cell mobilization. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008. 17(11): p. 1749-60.
94. Fa.Genzyme, http://www.genzyme.com/corp/investors/Mozobil_PI.pdf.
95. Shiba, Y., et al., M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: the critical role of the SDF-1-CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(2): p. 283-9.
96. Manka, D.R., et al., Arterial injury increases expression of inflammatory adhesion molecules in the carotid arteries of apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res*, 1999. 36(5): p. 372-8.
97. Lindner, V., J. Fingerle, and M.A. Reidy, Mouse model of arterial injury. *Circ Res*, 1993. 73(5): p. 792-6.
98. Durect Corporation, Alzet mini osmotic pump Modell 2004, <http://www.alzet.com/downloads/2004specs.pdf>
99. Theeuwes, F. and S.I. Yum, Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann Biomed Eng*, 1976. 4(4): p. 343-53.
100. Hu, J et al., AMD3465, a Novel CXCR4 Receptor Antagonist, Abrogates Schistosomal Antigen-Elicited (Type-2) Pulmonary Granuloma Formation. *Am J Pathol* 2006, 169; 424-432
101. Ormerod, M., *Flow Cytometry A Basic Introduction*. 2008: denovosoftware.
102. Movat, H.Z., Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol*, 1955. 60(3): p. 289-95.
103. Olah, A.J., et al., Differential staining of calcified tissues in plastic embedded microtome sections by a modification of Movat's pentachrome stain. *Stain Technol*, 1977. 52(6): p. 331-7.

104. Skalli, O., et al., A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*, 1986. 103(6 Pt 2): p. 2787-96.
105. Ho, M.K. and T.A. Springer, Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1982. 128(3): p. 1221-8.
106. Hristov, M., et al., Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res*, 2007. 100(4): p. 590-7.
107. Werner, M., et al., Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, 2000. 24(7): p. 1016-9.
108. Scholzen, T. and J. Gerdes, The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 2000. 182(3): p. 311-22.
109. Duchrow, M., J. Gerdes, and C. Schluter, The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms. *Cell Prolif*, 1994. 27(5): p. 235-42.
110. Libby, P., Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 1995. 91(11): p. 2844-50.
111. Lagerqvist, B., et al., Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden. *N Engl J Med*, 2007. 356(10): p. 1009-19.
112. Stone, G.W., et al., Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med*, 2007. 356(10): p. 998-1008.
113. Garcia-Moruja, C., et al., Functional characterization of SDF-1 proximal promoter. *J Mol Biol*, 2005. 348(1): p. 43-62.
114. Murdoch, C., CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev*, 2000. 177: p. 175-84.
115. Sierro, F., et al., Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(37): p. 14759-64.
116. Korbiling, M. and Z. Estrov, Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*, 2003. 349(6): p. 570-82.

117. Rivard, A., et al., Early cell loss after angioplasty results in a disproportionate decrease in percutaneous gene transfer to the vessel wall. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(5): p. 711-21.
118. Walsh, K., R.C. Smith, and H.S. Kim, Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res*, 2000. 87(3): p. 184-8.
119. Beohar, N., et al., Antirestenotic effects of a locally delivered caspase inhibitor in a balloon injury model. *Circulation*, 2004. 109(1): p. 108-13.
120. Schwartz, S.M., Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest*, 1997. 99(12): p. 2814-6.
121. Sata, M., Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med*, 2003. 13(6): p. 249-53.
122. Asahara, T., et al., Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*, 1995. 91(11): p. 2793-801.
123. Wight, T.N., The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 1995. 6(5): p. 326-34.
124. Hillebrands, J.L., et al., Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest*, 2001. 107(11): p. 1411-22.
125. Saiura, A., et al., Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med*, 2001. 7(4): p. 382-3.
126. Religa, P., et al., Smooth-muscle progenitor cells of bone marrow origin contribute to the development of neointimal thickenings in rat aortic allografts and injured rat carotid arteries. *Transplantation*, 2002. 74(9): p. 1310-5.
127. Kollet, O., et al., HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*, 2003. 112(2): p. 160-9.

128. Askari, A.T., et al., Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*, 2003. 362(9385): p. 697-703.
129. Weber, C., A. Schober, and A. Zernecke, Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(11): p. 1997-2008.
130. Massberg, S., et al., Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*, 2006. 203(5): p. 1221-33.
131. Sweeney, E.A., et al., Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood*, 2002. 99(1): p. 44-51.
132. Hattori, K., et al., Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 2001. 97(11): p. 3354-60.
133. Petit, I., et al., G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 2002. 3(7): p. 687-94.
134. Baggiolini, M., Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 1998. 392(6676): p. 565-8.
135. Nagasawa, T., et al., Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 1996. 382(6592): p. 635-8.
136. Aiuti, A., et al., The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*, 1997. 185(1): p. 111-20.
137. Peled, A., et al., Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 1999. 283(5403): p. 845-8.
138. Bleul, C.C., et al., The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 1996. 382(6594): p. 829-33.

139. Oberlin, E., et al., The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 1996. 382(6594): p. 833-5.
140. Liles, W.C., et al., Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*, 2003. 102(8): p. 2728-30.
141. Devine, S.M., et al., Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 2004. 22(6): p. 1095-102.
142. Broxmeyer, H.E., et al., Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*, 2005. 201(8): p. 1307-18.
143. Flomenberg, N., et al., The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood*, 2005. 106(5): p. 1867-74.
144. Calandra, G., et al., AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34+ cells from non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment: compassionate use data. *Bone Marrow Transplant*, 2008. 41(4): p. 331-8.
145. Bodart, V., et al., Pharmacology of AMD3465: a small molecule antagonist of the chemokine receptor CXCR4. *Biochem Pharmacol*, 2009. 78(8): p. 993-1000.
146. Broxmeyer, H.E., et al., Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*, 2005. 201(8): p. 1307-18.
147. Burroughs, L., et al., Durable engraftment of AMD3100-mobilized autologous and allogeneic peripheral-blood mononuclear cells in a canine transplantation model. *Blood*, 2005. 106(12): p. 4002-8.
148. Lack, N.A., et al., A pharmacokinetic-pharmacodynamic model for the mobilization of CD34+ hematopoietic progenitor cells by AMD3100. *Clin Pharmacol Ther*, 2005. 77(5): p. 427-36.

149. Rosenkilde, M.M., et al., Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *J Biol Chem*, 2004. 279(4): p. 3033-41.
150. Kathiresan, S., et al., Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet*, 2009. 41(3): p. 334-41.
151. Zernecke, A. and C. Weber, Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 86(2): p. 192-201.
152. Xu, Q., Progenitor cells in vascular repair. *Curr Opin Lipidol*, 2007. 18(5): p. 534-9.
153. Versari, D., L.O. Lerman, and A. Lerman, The importance of reendothelialization after arterial injury. *Curr Pharm Des*, 2007. 13(17): p. 1811-24.
154. Aicher, A., et al., Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res*, 2007. 100(4): p. 581-9.
155. Walter, D.H., et al., Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2002. 105(25): p. 3017-24.
156. Werner, N., et al., Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(10): p. 1567-72.
157. Foteinos, G., et al., Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2008. 117(14): p. 1856-63.
158. George, J., et al., Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(12): p. 2636-41.

159. Silvestre, J.S., et al., Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation*, 2003. 108(23): p. 2839-42.
160. Werner, N., et al., Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*, 2003. 93(2): p. e17-24.
161. Liehn, E.A., A. Schober, and C. Weber, Blockade of keratinocyte-derived chemokine inhibits endothelial recovery and enhances plaque formation after arterial injury in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(10): p. 1891-6.
162. Hristov, M. and C. Weber, Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*, 2004. 8(4): p. 498-508.
163. Serruys, P.W., et al., A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med*, 1994. 331(8): p. 489-95.
164. Horlitz, M., U. Sigwart, and J. Niebauer, Fighting restenosis after coronary angioplasty: contemporary and future treatment options. *Int J Cardiol*, 2002. 83(3): p. 199-205.
165. Fischman, D.L., et al., A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med*, 1994. 331(8): p. 496-501.
166. Bertrand, M.E., et al., Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation*, 2000. 102(6): p. 624-9.
167. Steffel, J., et al., Rapamycin, but not FK-506, increases endothelial tissue factor expression: implications for drug-eluting stent design. *Circulation*, 2005. 112(13): p. 2002-11.

168. Stahli, B.E., et al., Paclitaxel enhances thrombin-induced endothelial tissue factor expression via c-Jun terminal NH2 kinase activation. *Circ Res*, 2006. 99(2): p. 149-55.
169. Steffel, J., T.F. Luscher, and F.C. Tanner, Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 2006. 113(5): p. 722-31

8 Abkürzungsverzeichnis

ACC	Arteria carotis communis
AP-1	Activator protein 1
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E defizient
BSA	bovine serum albumine, Rinder-serumalbumin
CCA	Arteria carotis communis
CCD	Continous Collision Detection
CCRF-CEM-Zelllinie	Humane Akute Lymphozytische Leukämie Zell-Linie
CD	cluster of differentiation
c-Kit	Tyrosinkinase Kit, CD117, Stammzellfaktorrezeptor
CXCL12	stromal cell-derived factor 1 α
CXCR4	Chemokine C-X-C-motif-Rezeptor 4
DAB	Diaminobenzidin
DES	drug eluting stents
DP	dot-plot
ECA	Arteria carotis externa
ENA-78	epithelial cell-derived neutrophil-activating protein-78
EGF	epidermal growth factor
EPC	endotheliale Progenitorzellen
ERK	extracellular signal regulated kinases
FACS®	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FDA	Federal Drug Agency
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	forward light scatter
GCS-F	Granulozytnekolonie-stimulierendes Faktor
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GRO- α	growth-related oncogene- α

HIF-1 α	hypoxia inducible factor 1 α
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	horseradish peroxidase, Merretichperoxidase
HSC	hämatopoetische Stammzellen
ICA	Arteria carotis interna
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IgG	Immunglobulin G
IF	Immunofluoreszenz
IH	Immunohistochemie
IL-6, IL-8	Interleukin 6, bzw. 8
IP	intraperitoneal
IVC	einzelventiliertes Käfig
JAK	Janus Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
KS	Kaninchenserum
Lin	Lineage
LDL	Low density lipoprotein
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität zu München
LTB ₄	Leukotrien B ₄
Mac-2	Makrophagenantigen 2
MCS-F	Makrophagenkolonie-stimulierendes Faktor
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MMP	Matrix-metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
MZG	mononukläeres Zellen-Gate
NF-IL6	nuclear factor-interleukin 6
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NI	Neointima
NS	nicht signifikant
PBS	phosphate buffered saline, phosphat- gepufferte Kochsalzlösung
PBSF	preB-cell growth-stimulating factor

PCI	perkutane koronare Intervention
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR- β	platelet-derived growth factor rezeptor β
PE	Phycoerythrin
PI3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
Sca-1	stem cell antigen-1
SDF-1 α	stromal cell-derived factor 1 α
siRNA	small-inhibiting RNA
α -SMA	α -smooth muscle actin
SMC	smooth muscle cells,
SMMHC	smooth muscle myosin heavy chain
Sp1	Transkriptionsfaktor Sp1
SPC	smooth muscle progenitor cells, glatte Gefäßmuskelprogenitorzellen
SSC	sideward light scatter
STAT	signal transducers and activation of transcription
TGF- β	transforming growth factor- β
TMIV,VI	transmembrane domain IV, bzw. VI
TNT	Tris-NaCl-Tween Puffer
TSA	Tyramid Signal Amplification
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	vascular smooth muscle cells
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation

9 Danksagung

Für die ausgezeichnete und kompetente Betreuung, Motivation, Unterstützung, sowie um Überlassung dieses interessanten Themas möchte ich mich, im besonderen Maße, bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Schober bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kolleginnen aus der Arbeitsgruppe, Ela Karshovska, Patricia Reinhard, Brigitta Globke und Andrea Millet für die Unterstützung, Hilfe und den guten Rat bedanken.

Für die fachliche Unterstützung bedanke ich bei den Kollegen des Instituts für Molekulare Herz-Kreislaufforschung Aachen unter der Leitung von Prof. Dr. med. C. Weber.

Ein besonderer Dank geht an meine Frau Elke und meinen Sohn Leon für die Geduld, Motivation, und Rücksichtnahme.

10 Publikationen, Vorträge und Poster

Karshovska, E.*, **Zagorac, D.*** et al., A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury. J Thromb Haemost, 2008. 6(10): p. 1812-5.

14. Dreiländertagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Angiologie, München, 09.09 – 12.09.2007, Vortrag FV 10.2: A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury, **Zagorac. D** et al.

European Society of Cardiology Congress 2007, Vienna 01.09. – 05.09.2007, Postervortrag P4556,: A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury, **D. Zagorac** et al.

73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim von 12.04. - 14.04.2007, Vortrag V-634: A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury, **D. Zagorac** et al.

11 Lebenslauf

Name: Davor Zagorac

Geburtstag, Geburtsort: 23.08.1977, Banjaluka, Bosnien und Herzegowina

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Eltern: Tatjana Zagorac (Ökonomin), Anto Zagorac (Lehrer)

Schulbildung:

1984-1991 Grundschole „Esad Midzic“ in Banjaluka, Bosnien und Herzegowina

1991-1996 Schule für Krankenpflege in Zagreb, Kroatien

Hochschulbildung:

2002-2003 Studienkolleg München, Anerkennung des kroatischen Abiturs

2003-2009 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, Staatsexamen und Abschluss mit Gesamtdurchschnitt 1,16

Auszeichnungen:

Beste Studienleistung im MeCuM Modul 2, Innere Medizin, für WS 06/07 ausgezeichnet und dotiert mit 100€ Büchergutschein durch den Studiendekan Prof. Dr. med. M. Reincke.

2. Platz beim „Benjamin Franklin Contest“ der Charité Berlin, einem kompetitiven Wettbewerb für Medizinstudenten aus der Bundesrepublik Deutschland und Österreich, bei dem theoretische und praktische Fertigkeiten geprüft wurden.

Wissenschaftlicher Werdegang:

Experimentelle Promotionsarbeit „Auswirkungen des kleinmolekularen CXCR-4 Inhibitors AMD3456 auf die Neointimabildung nach Induktion der akzelerierten Atherosklerose in ApoE-defizienten Mäusen“, Betreuung durch Prof. Dr. med. A. Schober, Medizinische Poliklinik Innenstadt der LMU, Abteilung für Kardiologie

Beruf:

10/1996- 08/2008	Anstellung als Krankenpfleger im Kreiskrankenhaus München-Perlach jetzt Kliniken München-Pasing und -Perlach
11/2009	Approbation als Arzt
12/2009- 10/2011	Anstellung als Assistenzarzt im Kreisklinikum Ebersberg, Abteilung für Innere Medizin
Seit 11/2011	Anstellung als Assistenzarzt im RoMed Klinikum Rosenheim, Medizinische Klinik I